

**Charakterisierung der RNA-Bindungsaktivität
von VP30 im Hinblick auf die virale
Transkriptionsregulation des Ebolavirus**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Dipl.-Chem. Julia Schlereth
aus Bad Neustadt a.d. Saale

Marburg/Lahn 2015

Erstgutachter: Prof. Dr. Roland K. Hartmann
Zweitgutachter: Prof. Dr. Stephan Becker

eingereicht am 14.10.15

Tag der mündlichen Prüfung am 25.11.15

Hochschulkennziffer: 1180

Zusammenfassung

Das Ebolavirus ist ein humanpathogenes RNA-Virus, das bei Menschen und Primaten hämorrhagisches Fieber mit Letalitätsraten von bis zu 90% auslösen kann. Das Virus tritt in Form von unvorhersehbaren, sporadischen Ausbrüchen v.a. in Afrika auf und rückte aufgrund des bisher dramatischsten Ausbruches (seit 2013/2014) mit bisher über 28 000 Fällen (davon ca. 11 000 Todesfälle) stärker in das öffentliche Interesse.

Das Virus besteht aus einem negativ orientierten Einzelstrang-RNA-Genom mit sieben proteinkodierenden Genen. Für die Replikation des viralen Genoms sind drei dieser Proteine notwendig: die RNA-abhängige RNA-Polymerase (L), das virale Protein 35 (VP35) und das Nukleoprotein (NP). Für die Transkription wird zusätzlich das virale Protein 30 (VP30) benötigt. Über Phosphorylierung von zwei Serin-Clustern in der N-proximalen Region von VP30 wird dessen Aktivität als Transkriptionsfaktor maßgeblich reguliert; im dephosphorylierten Zustand fungiert es als Transkriptionsfaktor und geht eine Interaktion mit VP35 ein, während es im phosphorylierten Status als inaktiver Transkriptionsfaktor den Kontakt zu VP35 verliert und mit dem Nukleoprotein interagiert. Als Folge wechselt die RNA-Polymerase in den replikativen Modus. Die strikte VP30-Abhängigkeit der Transkription wird durch eine stabile Haarnadelstruktur auf dem Genom/Antigenom (nt 56-78) vermittelt und kann durch eine eingeführte strukturelle Schwächung aufgehoben werden. VP30 ist ein RNA-bindendes Protein, das als Hexamer, bestehend aus drei Dimeren, vorliegt und ein unkonventionelles Zinkfinger-Motiv (Cys₃His) besitzt. Außerdem fungiert es neben VP35 und VP40 als *suppressor of RNA silencing*.

Zentraler Ansatzpunkt dieser Arbeit war es die RNA-Bindungsfähigkeit von VP30 im Hinblick auf seine Funktion als Transkriptionsfaktor zu untersuchen. Daraus ergaben sich vier Teilprojekte: (i) die Etablierung eines *in vitro* Assays zu Analyse von RNA:VP30-Komplexen, (ii) die Charakterisierung der RNA-Bindungseigenschaften von VP30, (iii) der Nachweis eines möglichen Zusammenhangs zwischen Transkriptionsaktivierung und RNA-Bindung von VP30 und (iv) eine Transkriptomanalyse zum Verständnis der transkriptionellen Regulation durch VP30.

Die Untersuchungen der RNA:VP30-Bindung basierten in erster Linie auf einer modifizierten Variante des EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*), anhand derer unter nativen Bedingungen Affinitäten (in Form von apparenten K_d -Werten) und verschiedene Komplexpopulationen untersucht werden konnten. Die Ergebnisse der Untersuchungen zu den RNA-Bindungseigenschaften von VP30 ließen darauf schließen, dass die VP30:RNA-Wechselwirkung stark elektrostatisch geprägt ist und vornehmlich mit einzelsträngigen RNA-Substraten stattfindet. Einen erheblichen Einfluss auf die Bindungsaffinitäten hatte die Länge der einzelsträngigen Bereiche, wobei ein Affinitätsoptimum bei ca. 37 Nukleotiden beobachtet wurde. Im viralen Kontext wurden die 3'-terminalen ca. 150 Nukleotide des

Genoms sowie die entsprechend komplementäre Sequenz des Antigenoms zunächst auf potenzielle Strukturelemente hin untersucht und anschließend einer Deletionsanalyse unterzogen. Hierbei bestätigte sich die Präferenz für ungepaarte RNA-Bereiche, wobei der Haarnadelstruktur (nt 56-78) eine affinitätssteigernde Wirkung zugewiesen werden konnte. Zusätzlich wurde gezeigt, dass eine 5'-Kappe am viralen mRNA-Substrat die Bindungsaffinität deutlich im Vergleich zu 5'-Mono- und 5'-Triphosphat-Enden verschlechterte.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen RNA-Bindung und Transkriptionsaktivierung von VP30 nachzuweisen, wurden die transkriptionsinaktiven Varianten VP30_DD (imitiert phosphoryliertes VP30), VP30_5LA (Hexamerisierungs-defekt) und VP30_C72S (mutiertes Zinkfinger-Motiv) sowie die transkriptionsaktive Variante VP30_AA (imitiert dephosphoryliertes VP30) und der Wildtyp von VP30 rekombinant hergestellt und mittels EMSA auf ihre RNA-Bindungsfähigkeit getestet. Hierbei konnte für die Varianten VP30_5LA und VP30_C72S - im Einklang mit ihrer Transkriptionsinaktivität - nur noch eine basale RNA:VP30-Komplexbildung nachgewiesen werden. Auch die beiden Gegenstücke VP30_AA und VP30_DD zeigten RNA-Bindungsaffinitäten, die sich schlüssig zu ihren Transkriptionsdaten verhielten: VP30_AA (transkriptionsaktiv) bindet die RNA 4.3-fach affiner als VP30_DD (transkriptionsinaktiv). Das die beiden Serin-Cluster überlagernde Arginin-Cluster wurde anhand von drei Einzelmутanten (VP30_R26A, _R28A und _R40A) sowie einer Tripelmutante (VP30_3RA) bezüglich RNA-Bindungsfähigkeit und Transkriptionsaktivierung untersucht. Hierbei wurde beobachtet, dass die Einzelmутanten weder RNA-Bindung noch Transkriptionsaktivierung signifikant beeinflussten. Lediglich die Tripelmutante zeigte eine 2-fache Verschlechterung der RNA-Bindung, einen veränderten Bindungsmodus sowie eine erhebliche Beeinträchtigung der Transkriptionsfähigkeit. Zudem konnte gezeigt werden, dass die bereits nachgewiesene Interaktion zwischen VP30 und VP35 RNA-abhängig ist. Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Arbeit eine starke Korrelation zwischen RNA-Bindung und Transkriptionsaktivierung gezeigt und damit erstmals die RNA-Bindungsfähigkeit von VP30 in einen physiologischen Kontext gestellt.

Im Zuge einer Transkriptomanalyse mittels *Next Generation Sequencing* (NGS) konnten kurze Abbruchtranskripte im Bereich der mRNA-Starts der verschiedenen Gene detektiert werden, die genau mit den vorhergesagten Haarnadelstrukturen in diesen Regionen korrelierten. Zusätzlich konnte ein *leader*-Transkript und zwei Transkripte innerhalb der intergenischen Region zwischen VP30 und VP24 gefunden werden. Das *leader*-Transkript wurde anschließend experimentell durch Northern Blot bestätigt und sein Verhältnis zur mRNA (NP) durch RT-qPCR bestimmt (mRNA/*leader*-Transkript: ca. 8.7:1). Damit konnte erstmals die Existenz eines *leader*-Transkriptes für das Ebolavirus nachgewiesen werden, dessen potenzielle Funktion möglicherweise - analog zu *leader*-Transkripten anderer Viren - im Bereich der Regulation von Transkription vs. Replikation liegt.

Abstract

The Ebola virus is a human pathogenic RNA virus which can cause hemorrhagic fever with high case fatality rates up to 90%. Unpredictable and sporadic outbreaks occurring mainly in Africa are characteristic for this virus. Owing to the recent outbreak with over 28 000 infected people and about 11 000 deaths, the Ebola virus has attracted increasing public interest.

The Ebola virus harbors a negative single strand RNA genome of 19 kb with seven protein coding genes. For replication of the viral genome three of the viral proteins are necessary: the RNA-dependent RNA polymerase (L), the viral protein 35 (VP35) and the nucleoprotein (NP). In contrast, for transcription a fourth protein is required, namely the viral protein 30 (VP30). Phosphorylation of two serine clusters in the N-proximal region of VP30 regulates the protein's ability to support viral transcription; in its dephosphorylated state it functions as a transcription factor and interacts with VP35; by phosphorylation VP30 becomes transcriptionally inactive and loses the contact to VP35 while gaining affinity for the nucleoprotein. This results in a switch of the RNA polymerase to the replicative mode. The strict VP30 dependency of transcription is mediated by a stable hairpin structure on the viral genome/antigenome (nt 56-78) and can be abolished by weakening the structural stability of this hairpin. VP30 is known to bind RNA and to form a hexamer consisting of three dimers. Moreover, it possesses an unconventional zinc finger motif (Cys₃His) and was shown to act as suppressor of RNA silencing in addition to VP35 and VP40.

The central goal of this work was to investigate the RNA binding ability of VP30 with regard to its function as transcription factor. This gave rise to four part projects dealing with (i) the establishment of an appropriate *in vitro* assay to analyze RNA:VP30 complex formation, (ii) the characterization of the RNA binding properties of VP30, (iii) the possible correlation between transcriptional activation and RNA binding of VP30 and (iv) a comprehensive transcriptome analysis to deepen the understanding of the transcriptional regulation by VP30.

The RNA:VP30 interaction studies were mainly based on an EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) procedure tailored to VP30, which enabled us to measure binding affinities (in terms of apparent K_d values) and to visualize different types of RNA:VP30 complexes under native conditions. The results suggested that the RNA:VP30 interaction is strongly governed by electrostatic interactions. The preferential substrates were found to be single stranded RNAs with an optimal length of ~ 37 nt. Initially, we analyzed the 3'-terminal ~ 150 nt of the viral genome as well as the corresponding complementary antigenomic sequence for potential structures. A deletion analysis based on these two RNA substrates confirmed the preference of VP30 for single stranded regions. In addition, an affinity-enhancing effect of the hairpin structure (nt 56-78) could be observed. The comparison of different 5'-modifications (5'-Mono- or Triphosphate, 5'-Cap(0)) in an RNA substrate mimicking the 5'-terminal

sequence of the NP mRNA revealed a strong negative influence on VP30 binding by the presence of a 5'-Cap modification.

To explore the correlation between RNA binding and transcriptional activation of VP30, the transcriptionally inactive VP30 variants VP30_DD (mimicking the phosphorylated state), VP30_5LA (hexamerization-defective) and VP30_C72S (mutated zinc finger motif) as well as the transcriptionally active wild type and VP30_AA (mimicking the unphosphorylated state) were produced recombinantly. These VP30 variants were tested for their ability to bind RNA using the newly established EMSA procedure. Variants VP30_5LA and VP30_C72S - in line with their transcriptional inactivity - were essentially unable to bind RNA. Similarly, the two counterparts VP30_AA and VP30_DD showed RNA binding affinities that correspond to their ability to support viral transcription: VP30_AA (transcriptionally active) was able to bind RNA with a 4.3-fold lower K_d value than VP30_DD (transcriptionally inactive). The influence of the arginine cluster (overlapping with the two serine clusters) on RNA binding ability and transcriptional activation was investigated using three single mutants (VP30_R26A, _R28A, _R40A) as well as one triple mutant (VP30_3RA). All single mutants had little effect on RNA binding or transcriptional activation. Solely the triple mutant showed a twofold reduced RNA binding affinity, an altered RNA binding mode and a substantially impaired transcriptional activation. Additionally, we found that the complex formation between VP30 and VP35 strictly depends on the presence of RNA. In summary, we observed a strong correlation between RNA binding and transcriptional activation using different VP30 variants, thus pinpointing the physiological link between VP30's RNA binding ability and its function as transcription factor. In the course of a transcriptome analysis using Next Generation Sequencing (NGS) we were able to detect short transcripts in the mRNA start regions whose 3'-end coincided with the predicted hairpin structures there. Furthermore a leader transcript and two additional short transcripts were assigned to the intergenic region between the VP30 and VP24 genes. The 3'-leader transcript preceding the NP gene was confirmed experimentally by Northern Blot and its ratio to the first mRNA (NP) determined using RT-qPCR (mRNA/leader transcript: ~8.7:1). This is the first experimental evidence for the existence of a 3'-leader transcript of Ebola virus, which may exert - analogous to leader transcripts found in other viruses - a key function in the regulatory switch between viral transcription and replication.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	11
1.1	Filoviren	11
1.1.1	Taxonomie	11
1.1.2	Epidemiologie.....	12
1.1.3	Pathogenese.....	13
1.1.4	Therapie- und Vakzinierungsansätze	14
1.2	Das Ebolavirus	16
1.2.1	Aufbau des Viruspartikels.....	16
1.2.2	Organisation des Genoms.....	17
1.2.3	Vermehrungszyklus des Ebolavirus.....	19
1.3	Das virale Protein 30.....	21
1.3.1	Funktionen und Domänen	21
1.3.2	VP30 als essenzieller Transkriptionsfaktor	22
1.3.3	VP30 im Vergleich zu M2-1 (RSV)	23
1.4	Fragestellung	24
1.4.1	Teilprojekt 1: Etablierung eines Bindungsassays (EMSA) zur Detektion von RNA:VP30-Komplexen.....	25
1.4.2	Teilprojekt 2: <i>In vitro</i> Charakterisierung der RNA-Bindungsaktivität von VP30.....	26
1.4.3	Teilprojekt 3: Zusammenhang zwischen transkriptioneller Regulation und RNA-Bindefähigkeit von VP30	26
1.4.4	Teilprojekt 4: Transkriptomanalyse zum Verständnis der transkriptionellen Regulation durch VP30	27
2	Material und Methoden.....	28
2.1	Puffer, Medien und Stammlösungen	28
2.2	Plasmide	28
2.2.1	pUC19-Vektor	28
2.2.2	pBADM41-Vektor	29
2.2.3	pProEx-Vektor.....	31
2.2.4	APP 356 (p3E-5ERLuc)-Vektor.....	31
2.3	Oligonukleotide	32
2.3.1	DNA-Oligonukleotide.....	32
2.3.2	RNA-Oligonukleotide.....	34
2.4	Bakterielle Zellkultur	35
2.4.1	Bakterienstämme	35

2.4.2	Bakterielle Zellkultur mit Flüssigmedium.....	35
2.4.3	Bakterielle Zellkultur mit Festmedium.....	36
2.4.4	Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm.....	36
2.4.5	Präparation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	36
2.4.6	Transformation bakterieller Zellen	37
2.5	Generelle Nukleinsäuretechniken.....	37
2.5.1	Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren.....	37
2.5.2	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäure-Lösungen.....	38
2.5.3	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	38
2.5.4	Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren	40
2.5.5	Visualisieren von Nukleinsäuren.....	42
2.6	DNA-Techniken.....	44
2.6.1	Plasmidpräparation	44
2.6.2	Phosphorylierung von 5'-OH-Gruppen	44
2.6.3	Dephosphorylierung von DNA	44
2.6.4	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	45
2.6.5	<i>DpnI</i> -Verdau.....	46
2.6.6	Ligation	47
2.6.7	Restriktionsverdau	47
2.6.8	Sequenzierung.....	49
2.7	RNA-Techniken.....	49
2.7.1	<i>In vitro</i> T7-Transkription	49
2.7.2	Dephosphorylierung von RNA	50
2.7.3	Hydrolyse des 3'-terminalen 2',3'-Cyclophosphates	50
2.7.4	Modifikation der RNA mit einer 5'-Cap(0)-Struktur	51
2.7.5	Hybridisierung von DNA:RNA Komplexen	52
2.7.6	Northern Blot.....	52
2.7.7	RT-qPCR	54
2.8	Protein-Techniken	56
2.8.1	Expression und Aufreinigung von MBP-VP30 ₈₋₂₇₂	56
2.8.2	Expression und Aufreinigung von VP30 _{CTD}	58
2.8.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	59
2.8.4	Ankonzentrieren von Proteinproben	60
2.8.5	SDS-PAGE	60
2.8.6	Western Blot	61
2.8.7	Abspaltung des MBP-tag mittels TEV-Protease	62

2.9	Analyse von RNA-Sekundärstrukturen	62
2.9.1	Bioinformatische Vorhersage	62
2.9.2	Experimentelle Strukturanalyse	62
2.10	Analyse von RNA:DNA- und RNA:Protein-Interaktionen	65
2.10.1	DRaCALA	65
2.10.2	EMSA.....	66
2.11	Verwendete Software und Bioinformatische Programme.....	68
2.11.1	GraFit.....	68
2.11.2	CorelDRAW Graphics Suite	68
2.11.3	National Center for Biotechnology Information (NCBI).....	68
2.11.4	ViennaRNA Web Services.....	68
2.11.5	Mfold Web Server	69
2.11.6	IDT OligoAnalyzer 3.1	69
2.11.7	Clustal W2.....	69
2.11.8	ExPASy Bioinformatics Resources Portal (SIB)	69
3	Ergebnisse und Diskussion	70
3.1	Etablierung eines Bindungsassays (EMSA) zur Detektion von RNA:VP30-Komplexen.....	70
3.1.1	DRaCALA als Basis für Untersuchungen der RNA:VP30-Interaktion.....	70
3.1.2	Etablieren der modifizierten EMSA-Variante	71
3.1.3	Physiologische Funktion von MBP-VP30 in Viruspartikeln	74
3.1.4	RNA-Bindungsverhalten von MBP-VP30 vor und nach Behandlung mit TEV-Protease.....	75
3.1.5	RNA-Bindungsverhalten von VP30 nach unterschiedlicher Protein-aufreinigung	76
3.1.6	Zusammenfassung.....	78
3.2	<i>In vitro</i> Charakterisierung der RNA-Bindungsaktivität von VP30.....	80
3.2.1	Strukturelle Untersuchung der viralen RNA-Substrate.....	80
3.2.2	Untersuchung der RNA:VP30-Bindung anhand viraler RNA-Substrate.....	86
3.2.3	Untersuchung der RNA-Bindung anhand nicht-viraler Substrate	93
3.2.4	Zusammenfassung und Diskussion.....	97
3.3	Zusammenhang zwischen transkriptioneller Regulation und RNA-Bindungsfähigkeit von VP30	102
3.3.1	Einfluss des Phosphorylierungsstatus von VP30 auf die RNA-Bindung.....	102
3.3.2	Einfluss der Hexamerisierung und des Zinkfinger-Motivs von VP30 auf die RNA-Bindung	104
3.3.3	Einfluss der C-terminalen Domäne auf die RNA-Bindung.....	105

3.3.4	Untersuchung des Arginin-Clusters auf seine Bedeutung für die RNA-Bindung und Transkriptionsaktivierung.....	106
3.3.5	Bildung verschiedener RNA:VP30-Komplexe.....	111
3.3.6	Einfluss von RNA auf die Interaktion von VP30 und VP35 und deren Homo-Oligomerisierung.....	113
3.3.7	Zusammenfassung und Diskussion.....	115
3.4	Transkriptomanalyse zum Verständnis der transkriptionellen Regulation durch VP30	120
3.4.1	Transkriptomanalyse EBOV-infizierter humaner Zellen	120
3.4.2	Einfluss von genomischen Mutationen und der Präsenz von VP30 auf das virale Transkriptom unter Verwendung des Minigenom-Systems	138
4	Ausblick.....	147
4.1	Bestimmung der authentischen RNA-Bindungsstelle von VP30	147
4.2	Untersuchung der funktionellen Rolle des <i>leader</i> -Transkriptes.....	148
4.3	Untersuchung der Haarnadelstrukturen des Ebolavirus.....	149
5	Literaturverzeichnis	150
	Anhang.....	157

1 Einleitung

1.1 Filoviren

1.1.1 Taxonomie

Das Ebolavirus ist ein hochpathogenes RNA-Virus, das zusammen mit den Marburg- und Cuevaviren die Familie der Filoviren (*Filoviridae*) bildet. Sie erhielten ihren Namen aufgrund ihrer fadenähnlichen Form und gehören zur Ordnung der *Mononegavirales*, die sich durch ein kontinuierliches Einzelstrang RNA-Genom in Negativ-Orientierung auszeichnen (im Folgenden als (-) RNA-Genom bezeichnet). Weitere Vertreter dieser Ordnung sind Rhabdoviren (z.B. Tollwutvirus), Bornaviren und Paramyxoviren (z.B. Masern- oder Mumpsvirus) (s. Abb. 1; [1,2]).

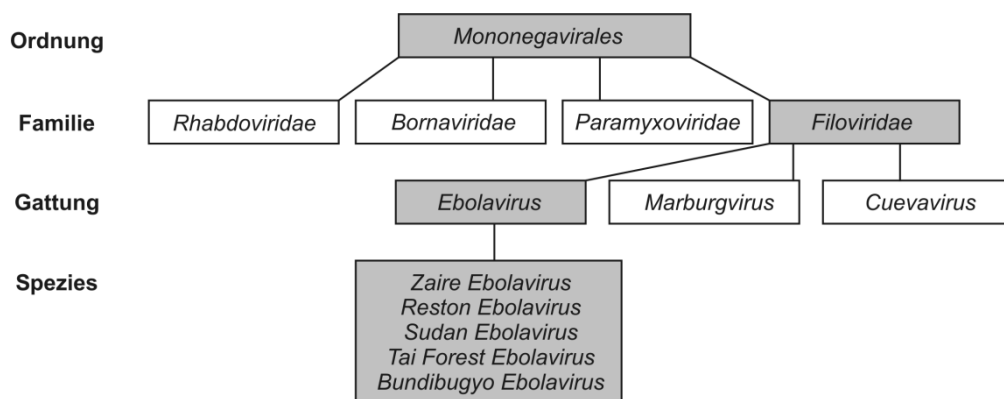


Abb. 1 Übersicht der Taxonomie der *Mononegavirales*. Grau hinterlegt sind die taxonomischen Zuordnungen für das Ebolavirus (nach [1]).

Bisher sind fünf Spezies des Ebolavirus bekannt, darunter die vier humanpathogenen Varianten *Zaire Ebolavirus* (EBOV; alt: ZEBOV), *Sudan Ebolavirus* (SUDV; alt: SEBOV), *Tai Forest Ebolavirus* (TAFV) und *Bundibugyo Ebolavirus* (BDBV) und eine vermutlich nicht-humanpathogene Virusspezies namens *Reston Ebolavirus* (RESTV; alt: REBOV). Neben ihrem geographischen Ursprung und ihrer genetischen Divergenz unterscheiden sie sich vor allem in ihrer Letalität.

Zusätzlich wurde im Jahr 2011 die erste filovirale Spezies in Europa identifiziert, die nach ihrem Entdeckungsort Cueva del Lloviu den Namen *Lloviu cuevavirus* (LLOV) erhielt und eine eigene Gattung (*Cuevavirus*) der *Filoviridae* repräsentiert [3].

1.1.2 Epidemiologie

Im Jahr 1967 wurde erstmals ein Filovirus im Zusammenhang mit einer Infektion von Labormitarbeitern in Marburg und Belgrad nach Kontakt mit grünen Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*) isoliert und dementsprechend Marburgvirus genannt [4]. Weitere Fälle von Filovirus-Infektionen, die hämorrhagisches Fieber verursachten, traten 1976 im Südsudan und im Norden von Zaire (heute: Demokratische Republik Kongo) auf und erhielten ihren Namen nach dem afrikanischen Fluss Ebola [5,6]. Es handelte sich hierbei um zwei verschiedene Ebolavirus-Spezies, die nach ihrer geographischen Entdeckung als *Zaire Ebolavirus* (EBOV) und *Sudan Ebolavirus* (SUDV) bezeichnet werden [7]. Zwei weitere Ebolavirus-Spezies namens *Tai Forest Ebolavirus* (TAFV) und *Bundibugyo Ebolavirus* (BDBV) wurden 1994 im Tai-Nationalpark (TAFV) und 2007 im Distrikt Bundibugyo (Uganda) (BDBV) isoliert [8,9].

Im Gegensatz zu den anderen genannten Ebolavirus-Spezies stellt das 1989 beschriebene *Reston Ebolavirus* (RESTV), das aus importierten Cynomolgus-Affen (*Macaca fascicularis*) in Reston (USA) isoliert wurde, scheinbar keine humanpathogene Variante des Ebolavirus dar [10].

Seit der Entdeckung der Filoviren kam es hauptsächlich in Zentral-, Süd- und Nordostafrika zu zahlreichen sporadischen und unvorhersehbaren Ausbrüchen, deren Ausmaß sehr stark variierte. Im Fall des Marburgvirus wurden bisher ca. 10 Ausbrüche registriert, wobei bei den zwei stärksten Ausbrüchen 150 (1998-2000 Demokratische Republik Kongo; 83% Letalität) bzw. 250 Erkrankte (2005 Angola; 90% Letalität) verzeichnet wurden (s. Abb. 2 A).

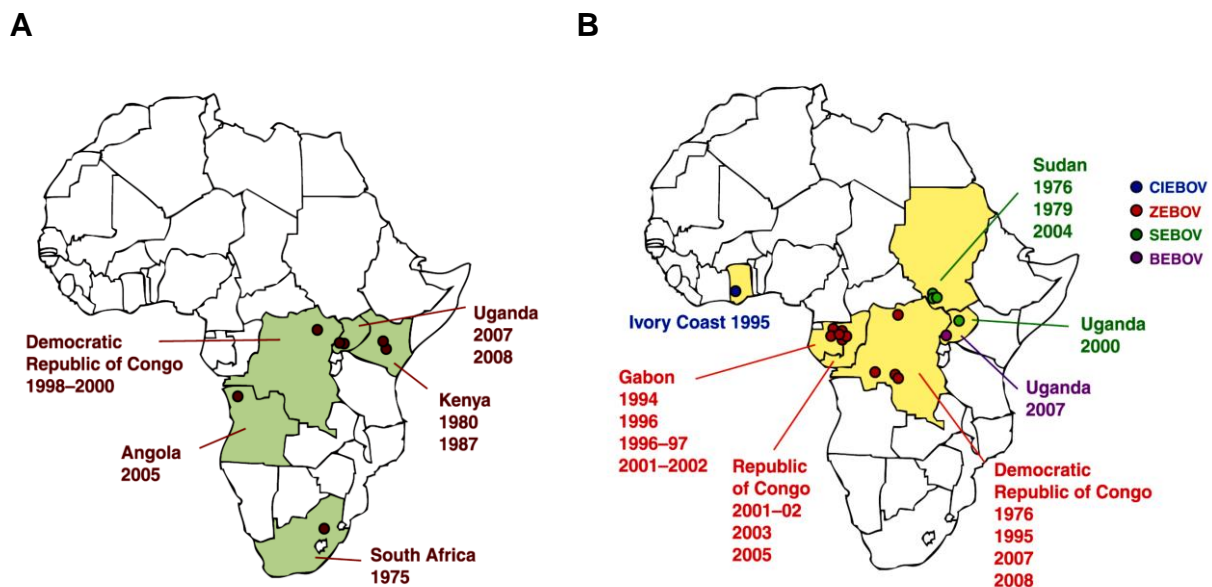


Abb. 2 Übersicht über Ausbrüche von Filoviren in Afrika. (A) Ausbrüche des Marburgvirus. (B) Ausbrüche des Ebolavirus; die verschiedenen Spezies sind mit dem entsprechenden Farbcode (s. Legende) dargestellt (aus [11]).

Für das Ebolavirus wurden seit 1976 über 20 Ausbrüche dokumentiert, die ebenfalls in Prävalenz und Letalität hauptsächlich aufgrund der für den Ausbruch verantwortlichen Ebolavirus-Spezies stark divergierten (s. Abb. 2 und Abb. 3; [11]).

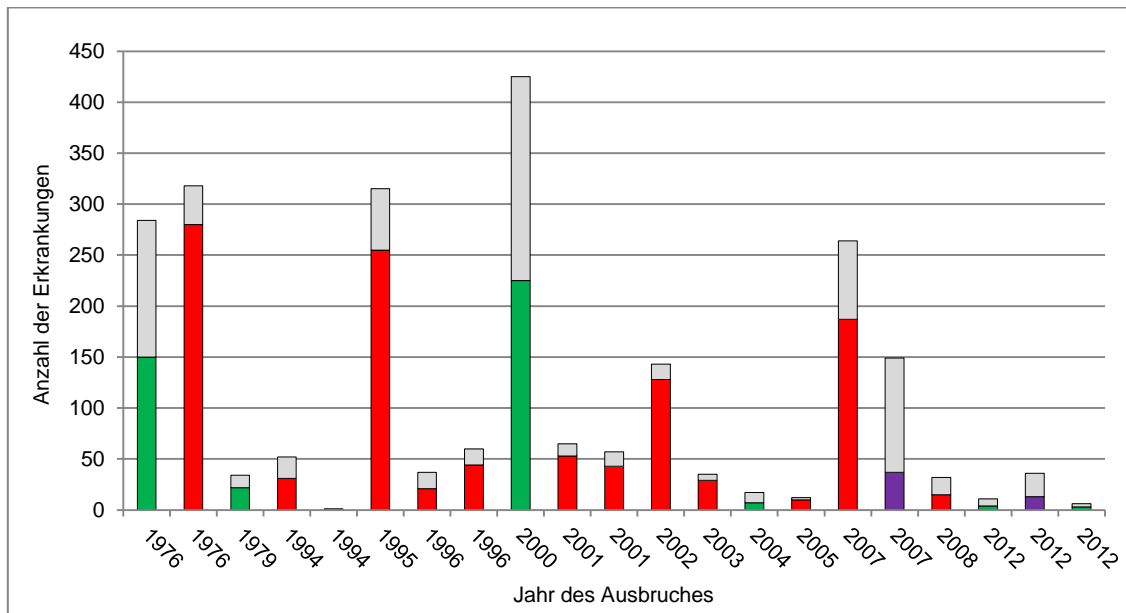


Abb. 3 Übersicht über die Ebolavirus-Ausbrüche von 1976-2012. Das Diagramm zeigt die bisher registrierten Ausbrüche von 1976 bis 2012, wobei die Balken die Gesamtzahl an Erkrankten abbilden. Der untere, farblich markierte Abschnitt des Balkens zeigt die Anzahl der Verstorbenen, wobei die Einfärbung die jeweilige Ebolavirus-Spezies repräsentiert (grün = SUDV; rot = EBOV; lila = BDBV); modifiziert nach [12]).

Im März 2014 wurden in Guinea mehrere Patienten positiv auf EBOV getestet, was der Startpunkt des bisher dramatischsten Ebolavirus-Ausbruches war. Bis Oktober 2015 wurden laut WHO mehr als 28 500 Fälle in Guinea, Sierra Leone und Liberia registriert, von denen über 11 000 tödlich verliefen [13]. Im Gegensatz zu den bisherigen Ebolavirus-Epidemien, die hauptsächlich in Zentral- und Nordostafrika lokalisiert waren (s. Abb. 2), sind vor allem westafrikanische Länder betroffen. Bisher konnte noch nicht genau geklärt werden, wie es zu dieser geographischen Verlagerung kam. Möglicherweise könnte sie mit einer Wanderung von Flughunden, die als wahrscheinliches Reservoir des Virus gelten, zusammenhängen [14].

1.1.3 Pathogenese

Der Hauptübertragungsweg einer Filovirus-Infektion ist der direkte Kontakt zu Infizierten oder Kadavern. Viruspartikel bzw. Virus-RNA werden bei infizierten Personen in Körperflüssigkeiten (z.B. Blut, Samen, Speichel) detektiert und können so z.B. über Läsionen der (Schleim-)haut der Kontaktperson auf den neuen Wirt übertragen werden [15]. Auch die Infektion durch Kontakt mit kontaminiertem Fleisch oder medizinischer Ausrüstung (z.B. Kanülen) wurde dokumentiert [4,5,16].

Die Inkubationszeit beträgt 2-21 Tage, wobei die ersten auftretenden Symptome sehr unspezifisch sind (Fieber, Müdigkeit, Kopfschmerzen, Erbrechen u.a.) und deshalb häufig mit denen anderer viraler Erkrankungen (z.B. Grippe oder Malaria) verwechselt werden. Das virale hämorrhagische Fieber tritt ungefähr am Höhepunkt des Krankheitsverlaufes auf und manifestiert sich in multiplen Störungen der Blutgerinnung [17].

Dendritische Zellen und Makrophagen scheinen in der Frühphase einer Infektion primäres Ziel des Virus zu sein und dienen somit als erster viraler Replikationsort. Ihre Verteilung und Mobilität über verschiedene Organe und Gewebe begünstigen dabei die schnelle Verbreitung des Virus im Körper [18]. Von den sekundären lymphatischen Organen und der Leber (dort findet eine starke Virusreplikation statt) wird das Virus auf Hepatozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und Epithelzellen übertragen [19,20]. Dennoch ist der Schaden, der in den erwähnten Organen und Geweben auftritt, vermutlich nicht für den dramatischen Ausgang der Infektion verantwortlich [18,19,20]. Vielmehr wird vermutet, dass ein so genannter „Cytokin-Sturm“ durch die Infektion von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen ausgelöst wird. Hierbei werden unkontrolliert Entzündungsmediatoren und Chemokine ausgeschüttet (z.B. Interleukin-1 β (IL-1 β), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), CCL3, CXCL10; [21,22,23,24,25]), was zur Folge hat, dass sich die Permeabilität der Endothelzellen erhöht, der vaskuläre Gefäßtonus reduziert wird und so immense vaskuläre Schäden entstehen [26].

Infizierte Makrophagen sind zudem durch die Expression des Gewebefaktors an der Entstehung intravaskulärer Koagulation beteiligt und zusammen mit infizierten dendritischen Zellen u.a. für die Apoptose von T-Zellen verantwortlich [27,28,29]. Der fatale Verlauf einer Ebolavirus-Infektion wird darüber hinaus mit einer gestörten adaptiven Immunantwort (humoral sowie zellulär) in Zusammenhang gebracht [30,31]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass virale Proteine (VP) eine effektive Immunantwort unterbinden können, indem die Synthese von Interferonen (z.B. durch das virale Protein 35) inhibiert oder die zelluläre RNA-Interferenz-Maschinerie (durch VP30, VP35 und VP40) unterlaufen wird [32,33].

Zusammenfassend deuten die bisherigen Erkenntnisse bezüglich des Erkrankungsverlaufs und der Immunantwort darauf hin, dass die Infektion von Antigen-präsentierenden Zellen (wie Makrophagen und dendritischen Zellen) und die damit einhergehende unkontrollierte Ausschüttung von Entzündungsmediatoren die Grundlage für den schwerwiegenden Krankheitsverlauf bilden, der in einer Art septischer Schock zum Tod durch Multiorganversagen führt.

1.1.4 Therapie- und Vakzinierungsansätze

Bis heute existieren weder Medikamente noch Impfstoffe, die zur Bekämpfung oder Prävention einer filoviralen Infektion im Menschen zugelassen sind. Daher erfolgte bisher

i.d.R. eine rein symptomatische Behandlung. Durch den aktuellen Ausbruch des Ebolavirus rückte jedoch die Notwendigkeit der Entwicklung wirksamer Medikamente und Impfstoffe stärker in den Fokus des öffentlichen Interesses. Derzeit gibt es verschiedene potenzielle Medikamente, die für die Behandlung einer Infektion mit dem Ebolavirus eingesetzt werden könnten. Im Zusammenhang mit dem aktuellen Ausbruch wurde durch die WHO der sogenannte „*compassionate use*“ von Medikamenten erlaubt, die in Tierstudien erfolgreich waren, jedoch bisher nicht am Menschen in klinischen Studien erprobt werden konnten [34].

Allen voran das Medikament ZMapp, das aus drei verschiedenen Ebolavirus-spezifischen Antikörpern besteht, die biotechnologisch in Tabakpflanzen produziert werden. Dieses Medikament wurde bereits bei dem aktuellen Ausbruch verwendet, um infizierte Personen passiv zu immunisieren. Derzeit ist die Herstellung von ZMapp sehr zeitaufwändig und daher seine Verfügbarkeit stark limitiert [35]. Klinische Studien zur Überprüfung von dessen Sicherheit und Wirksamkeit befinden sich derzeit in den klinischen Phasen I und II [36].

Andere vielversprechende Kandidaten zur Behandlung einer Ebolavirus-Infektion sind TKM-Ebola und Favipiravir. Ersteres basiert auf dem Prinzip der RNA-Interferenz, um die virale Replikation durch Virus-spezifische siRNAs zu inhibieren. Es befindet sich derzeit in der klinischen Phase I und bietet den Vorteil der einfachen Herstellung in großen Mengen [37]. Favipiravir ist ein Inhibitor der viralen RNA-Polymerase und in Japan bereits als Grippe-Medikament zugelassen worden. Auch hier können die relevanten Inhaltsstoffe einfach synthetisiert werden. Die Testung von Favipiravir als Medikament bei Ebolavirus-Infektionen befindet sich derzeit in der klinischen Phase II [38,39].

Einen prophylaktischen Schutz vor einer Ebolavirus-Infektion könnten Impfstoffe bieten. Seit Entdeckung des Ebolavirus gab es einige Ansätze in der Impfstoffentwicklung, die Wirksamkeit in Tierversuchen zeigten [40,41]. Große Schwierigkeiten bereiten in diesem Bereich jedoch die hohen Sicherheitsanforderungen, die Notwendigkeit von entsprechend geschultem Personal aufgrund des Umganges mit hochinfektiösen viralen Substanzen und die Durchführung der notwendigen Studien am Menschen.

Derzeit gibt es vor allem zwei vielversprechende Impfstoff-Kandidaten, für die bereits vielversprechende Ergebnisse in den ersten klinischen Phasen veröffentlicht wurden [42,43,44,45,46]. Einer davon ist der sogenannte cAd3 Ebolavirus-Impfstoff. Dieser basiert auf einem rekombinanten Adenovirus (aus Schimpansen) der als Vektor genutzt wird, um Glykoprotein aus EBOV und SUDV zu exprimieren. Nach Aufnahme des Vektors in Immunzellen und Expression des Glykoproteins wird das Immunsystem zur Bildung entsprechender spezifischer Antikörper angeregt [47,48]. Noch etwas weiter fortgeschritten ist ein weiterer Impfstoff-Kandidat, der als Basis rekombinantes vesikuläres Stomatitisvirus (VSV) verwendet. Das Virus wurde genetisch so verändert, dass es das Glykoprotein von EBOV exprimiert und daraus eine Ebolavirus-spezifische Immunantwort resultiert [48,49].

Kürzlich konnte hierbei der Nachweis erbracht werden, dass dieser Impfstoff in der Lage ist, Makaken gegen eine Infektion mit dem für den aktuellen Ausbruch verantwortlichen Ebolavirus-Stamm zu schützen [50].

1.2 Das Ebolavirus

1.2.1 Aufbau des Viruspartikels

Das Viruspartikel des Ebolavirus zeichnet sich durch seine charakteristische fadenähnliche Form aus (Länge: ca. 1 μm , Durchmesser: ca. 80 nm) ([51]; s. Abb. 4). Das Erscheinungsbild ist pleomorph, in den meisten Fällen erscheint es jedoch länglich oder in Form einer 6.

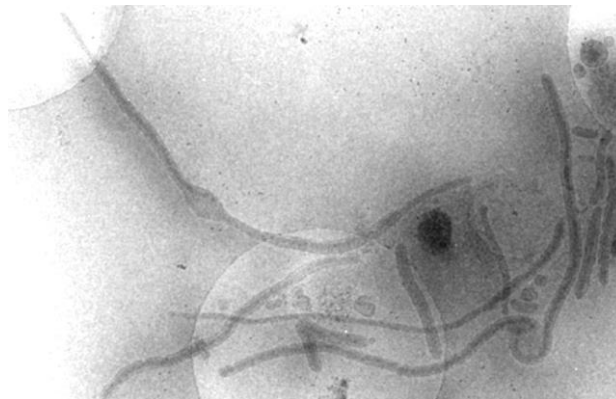


Abb. 4 Cryo-Elektronenmikroskopie-Aufnahme aufgereinigter Ebolavirus-Partikel. Die filamentösen Partikel weisen unterschiedliche Längen sowie Formen auf (aus [52]).

Im Inneren des Viruspartikels befindet sich ein helikales Nukleokapsid, bestehend aus dem einzelsträngigen (-) RNA-Genom, das vom Nukleoprotein (NP) enkapsidiert ist und so die Form einer Helix annimmt, sowie den viralen Proteinen 30 (VP30) und 35 (VP35). Die RNA-abhängige RNA-Polymerase L ist über ihren Kofaktor VP35 an das Nukleokapsid assoziiert ([52,53]; s. Abb. 5).

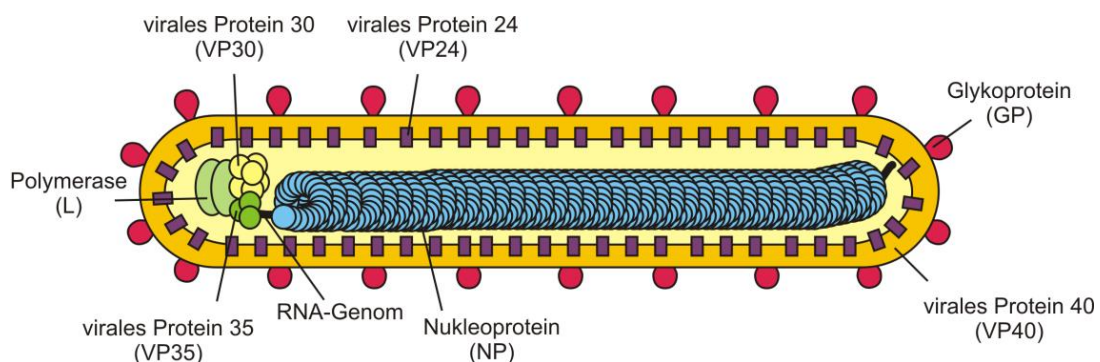


Abb. 5 Schema eines Viruspartikels. Das Virus besteht in seinem Inneren aus einem helikalen Nukleokapsid, das sich aus dem RNA-Genom (schwarz), dem Nukleoprotein (NP; hellblau) und den viralen Proteinen 30 (VP30; gelb) und 35 (VP35; grün) zusammensetzt. Die RNA-abhängige RNA-Polymerase L (hellgrün) ist über VP35 an das Nukleokapsid assoziiert. Auf der Innenseite der Virushülle befinden sich die beiden Matrixproteine VP40 (orange) und VP24 (violett), während auf der Virusoberfläche das Glykoprotein (GP; magenta) präsentiert wird.

Der virale Nukleokapsid-Komplex stellt die zentrale Einheit für Transkription und Replikation dar. Die beiden Matrixproteine VP24 und VP40 sind hauptsächlich an der Innenseite der Virushülle lokalisiert und ebenfalls in die Bildung des Nukleokapsids sowie den Zusammenbau (*Assembly*) und Knospung (*Budding*) des Virus involviert [54,55,56]. Auf der Oberfläche des Virus wird das in der Membran verankerte Glykoprotein (GP) als Homotrimer (aus GP_{1,2}) präsentiert ([57]; s. Abb. 5).

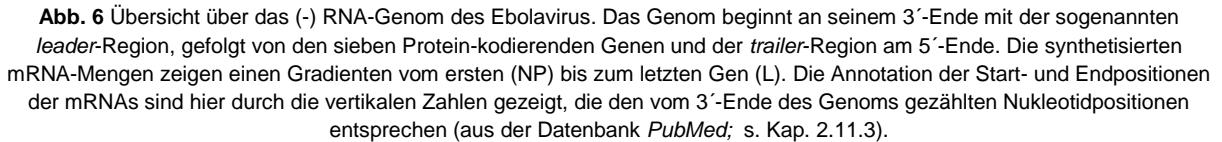
1.2.2 Organisation des Genoms

Das Ebolavirus besitzt ein nicht-segmentiertes (-) RNA-Genom mit einer Länge von ca. 19 kb. Es wird an seinen Enden von den sogenannten *leader*- (3'-Ende) und *trailer*-Regionen (5'-Ende) flankiert. Diese Bereiche sind essenziell für Transkription und Replikation. Die Gene der viralen Proteine sind in der Reihenfolge 3'-NP-VP35-VP40-GP-VP30-VP24-L-5' angeordnet, wobei ein Mengen-Gradient der mRNAs vom ersten (NP) bis zum letzten Gen (L) festgestellt werden konnte [84].

Unter den Proteinen des Ebolavirus ist GP hervorzuheben, da von diesem insgesamt drei verschiedene Varianten durch transkriptionelles *Editing* produziert werden. Nicht-editierte Transkripte des GP-Gens kodieren für eine lösliche Variante des Glykoproteins (*soluble glycoprotein*; sGP), das von infizierten Zellen sekretiert wird. Ungefähr 30% der Transkripte werden an einer aus sieben konsekutiven Uridin-Resten bestehenden *Editing-Site* kotranskriptional verändert (editiert). Die längste Proteinvariante, GP_{1,2}, wird als Oberflächenprotein in die virale Hüllmembran integriert und entsteht durch die Inkorporation eines achten Adenosins (+1) an der U₇-Region (*Editing-Site*). Zu einem verkürzten Transkript und damit zur Produktion des ssGP (*small soluble glycoprotein*) kommt es durch Einbau von zwei Adenosinen (+2) [58,59,60].

Die sieben Protein-kodierenden Gene werden entweder von sehr kurzen intergenischen Sequenzen (bis zu sechs Nukleotide) getrennt oder überlappen sogar (VP35/VP40; GP/VP30; VP24/L). Eine Ausnahme bildet der Übergang zwischen den Genen für VP30 und VP24, da hier die mit Abstand längste intergenische Region (144 Nukleotide) zu finden ist (s. Abb. 6).

Die *leader*-Region ist in der aktuellen Literatur nicht einheitlich definiert; laut der Datenbank *PubMed* schließt sie die Nukleotide 1-55 ein (wird auch in dieser Arbeit als Definition angenommen; an Position 56 beginnt die mRNA des ersten Proteins (NP); siehe auch [61,62]), in anderen Publikationen wird die Region auf den Bereich der Nukleotide 1-472 erweitert (dort beginnt der offene Leserahmen für das erste Protein; siehe [86,88]).



Promotorelement 1

EBOV	3'-	GCCUGUGUGUUUUUCUUUCUUAAAAAUCCUGAAAAACACACGCUUAUUGAUACUCCU	60
SUDV	3'-	GCCUGUGUGUUUUUCUUUCUUUUCAAAAAAUUGAAAAACACACGCUUAUUGAUACUCCU	60
RESTV	3'-	GCCUGUGUGUUUUUCUUUUUCCAAAAAUUCUGAAAAACACACGCUCAUUGAUACUCCU	60
BDBV	3'-	GCCUGUGUGUUUUUCUUCUCCUAAAACUAGAAAUAAACACACGCUCAUUGAUGCUCU	60
TAFV	3'-	GCCUGUGUGUUUUUCUUUCUCCAAAAACUAGAAAUAAACACACGCUUAUUGAUACUCCU	60

***** ** *** * ***** ***** *****

TSR Promotorelement 2

EBOV	UCUAAUUAUUAAAAGGAGAGUAACUUUAAAUAUAGCCUUAUUUUAAACUUUAACAAUGAC	120
SUDV	UCUAAUUAAGUAAAAGGAGUUUGAGUUUGAAUUAUUUGUAAACUCUAAACUAGAGUAGUAAA	120
RESTV	UCUAAUUGUCAAAAAGGAGUCAAAUUCUAUUAUGUGACUUUAACUCUAAACUCUAAAGAGGAAA	120
BDBV	UCUAAUUCUAAAAGGAGAGUAACUUU-----AACUUUAACUCUAAAGAUUAGAGCGGCC	114
TAFV	UCUAAUUAUUAAAAGGAGAGUAACUGU-----GAUGUAAUUCUAAUUCUAAAGAGUAAAC	114

***** ***** * * * *** * ** *

EBOV	--AUUAGUGUGGACCAACAAGUCUCGGU-GUAGUGU--	-5'	154
SUDV	UGGUUAACUCUGUUAAAUUGA---UCAGUUAGGGGGU--	-5'	154
RESTV	ACGAUAAGACAU-UGAAAGGGA---CCAAC---ACUGUUA	-5'	153
BDBV	UAGCUAGGGGUUAUGGUUGUGACUCUUAAACGGGACUUCUU	-5'	154
TAFV	UAGACAUGAAUGAGACUCCUAUUUAUUAACCACAAGUCUU	-5'	154

* *

18

Einige Viren mit (-) RNA-Genom besitzen die besondere und für das Virus essenzielle Eigenschaft, dass sich die Gesamtzahl der Basen des Genoms durch sechs teilen lässt (sog. *Rule of Six*), u.a. das Sendai-Virus und Nipah-Virus [63,64]. Dies ist bei Filoviren nicht der Fall, jedoch konnte auch hier festgestellt werden, dass der Replikationspromotor dieser Regel folgt und bei Verschiebungen des UN₅-Rasters (U = Uracil; N = jede Base) seine Funktion nicht mehr erfüllen kann [62].

Neben der *leader*-Region enthält auch die *trailer*-Region wichtige Replikationspromotor-Elemente. Die Sequenzen des *leaders* und des antigenomischen *trailers* (ctrailer) zeigen eine starke Konservierung innerhalb der ersten 50 Nukleotide (s. Abb. 8).

```

leader      3'- GCCUGUGUGUUUUUCUUUCUU--CU---UAAAAAUCCUAGAAAACACACGCUUAUUGAU 54
ctrailer    3'- ACCUGUGUGUUUUUCUUUCUUUAUCUAAAUAAAAAU--UUAAAAACACACGCGUAAAA 58
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

leader      AC-UCCUUCU---AAUUAUUAAGGAGAGUAACUUUAAUUAU-----AGCCUUA 100
ctrailer    AGGUCCUUAGGAAAAACGUUGCAAUAAGACCGCUCGGAAGACUACUCGCACCAGUUA 118
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

leader      AAUUUAACUUUAACAAUGACAUAUAGUG-UGGACCAAACAAAGUCUCGGU-----GUAGU -5' 153
ctrailer    GAAUUAUAGUAAUUGUGUCUUAUUAUAGAUACAGACGAUAUAACAUAUUCUCCAUAAA -5' 178
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

Abb. 8 Alignment zwischen der genomischen *leader*-Region und der komplementären *trailer*-Region (ctrailer). Im Bereich des ersten Promotorelements ist eine starke Konservierung zu beobachten, die auf eine wichtige Rolle dieses Elements für die Replikation hindeutet. Die Konservierung ist mit * unterhalb der Sequenzen angegeben. Das Alignment wurde mit ClustalW2 erstellt (s. Kap. 2.11.7).

Die starke Sequenzkonservierung zwischen diesen beiden Regionen ist Voraussetzung für eine effiziente Replikation. Eine dadurch mögliche Zyklisierung des Ebolavirus-Genoms (Bildung einer sogenannten *Panhandle*-Struktur durch Basenpaarung von *leader* und *trailer*), die bei vielen Viren ein wichtiger Bestandteil des Replikationsmechanismus ist, konnte allerdings bisher für das Ebolavirus nicht gezeigt werden [62,65].

1.2.3 Vermehrungszyklus des Ebolavirus

Der Eintritt des Ebolavirus in eine Wirtszelle wird durch das Glykoprotein (GP) vermittelt, z.B. durch die Wechselwirkung von Glykanen des GP mit C-Typ-Lektinen (u.a. TIM-1 (*T-cell immunoglobulin mucin domain-1*; [66,67,68]), aber auch β 1-Integrin und Tyrosin-Kinase-Rezeptoren wurden aufgrund ihrer Eigenschaft den Viruseintritt zu begünstigen in diesem Zusammenhang als *attachment*-Faktoren diskutiert [69,70,71].

Die Aufnahme des Viruspartikels erfolgt in erster Linie durch einen Makropinozytose-ähnlichen Mechanismus, wobei auch andere Möglichkeiten der Aufnahme bereits in Betracht gezogen wurden (z.B. Endozytose; [72,73,74,75]). Es gibt zudem Hinweise darauf, dass der GP-abhängige Viruseintritt in die Zelle simultan durch verschiedene der erwähnten Mechanismen und je nach Zelltyp auch unterschiedlich erfolgen könnte [74,75,76,77].

Im Folgenden wird GP durch endosomale Proteasen zu einer kleineren, Fusions-aktiven Form prozessiert (17-19 kDa; [78,79]). Das prozessierte GP bindet nun an das endo- und lysosomale Membranprotein Niemann-Pick C1 (NPC1), das den eigentlichen Rezeptor darstellt. Diese Interaktion ist ausschlaggebend für die Fusion der filoviralen und zellulären Membran, die schlussendlich zur Freisetzung des Nukleokapsids in das Cytoplasma führt [80,81].

Auf molekularer Ebene beginnt der Vermehrungszyklus des Ebolavirus mit der primären Transkription der viralen mRNAs auf Basis des (-) RNA-Genoms, die vermutlich kotranskriptional von der viralen Polymerase L mit 5'-Kappe sowie Poly(A)-Schwanz versehen werden [82,83]. Die Translation in die viralen Proteine erfolgt an den Ribosomen der Wirtszelle. Vom ersten (NP) bis zum letzten Gen (L) wurde ein Abundanz-Gradient der einzelnen mRNAs beobachtet, was zu einem entsprechenden Gradienten der Produktion der viralen Proteine führt [84]. Erst wenn ausreichende Mengen der viralen Proteine synthetisiert wurden (v.a. NP), beginnt die Replikation des Ebola-Genoms in die komplementäre (+) RNA, die auch als Antigenom bezeichnet wird. Das Antigenom wird während seiner Synthese von NP enkapsidiert und dient dann als Matrize zur Synthese neuer (-) RNA-Genome (s. Abb. 9). Im Verlauf der starken Amplifikation der Ebolavirus-Genome findet zeitgleich eine sekundäre Transkription an den neu synthetisierten Genomen statt.

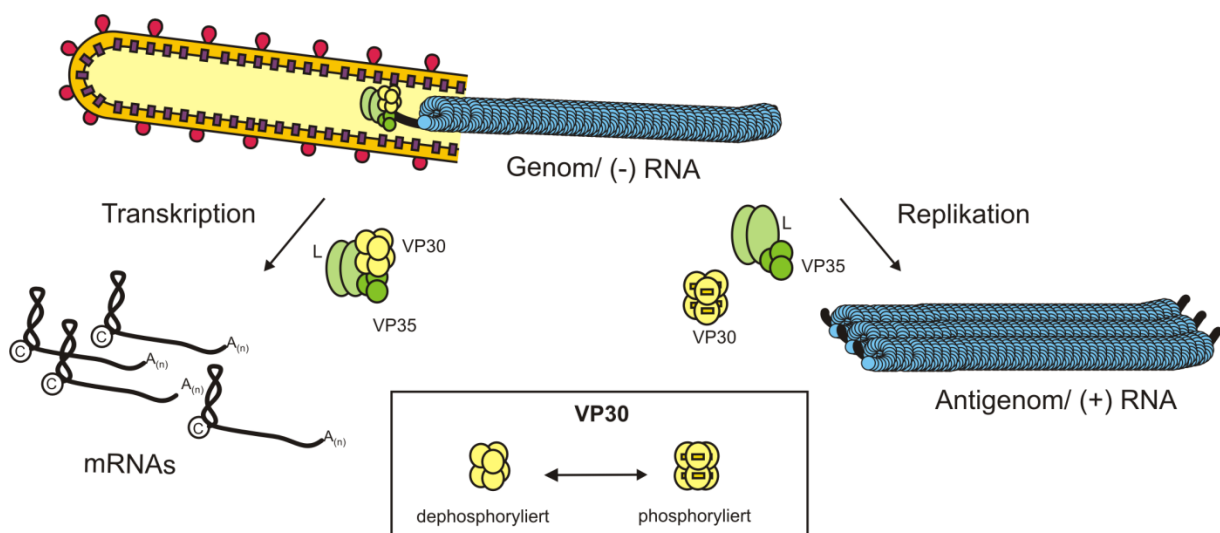


Abb. 9 Schema zur Transkription und Replikation des Ebolavirus-Genoms. Bei der Replikation sind drei virale Proteine essenziell: NP (blau), VP35 (grün) und L (hellgrün). Sie sind für die Bildung des Volllängen-Antigenoms zuständig, das wiederum als Templat für die Produktion des Genoms dient. Für die Transkription wird neben L und VP35 zusätzlich VP30 (gelb) als Transkriptionsfaktor benötigt. Die Aktivierung der Transkription durch VP30 ist stark abhängig von dessen Phosphorylierungsstatus. Im dephosphorylierten Status unterstützt VP30 über Assoziation mit VP35 die Transkription, während es im phosphorylierten Zustand nicht mit VP35 interagieren kann und infolgedessen die Replikation präferiert abläuft.

Der Transkriptionskomplex besteht aus vier verschiedenen viralen Proteinen: die RNA-abhängige RNA-Polymerase L, NP, VP35 und der essenzielle Transkriptionsfaktor VP30 (s.

Kap. 1.3.2 und Abb. 9). Im Gegensatz dazu findet die Replikation unabhängig von VP30 statt. Die Funktion von VP30 hängt stark von seinem Phosphorylierungszustand ab: im dephosphorylierten Zustand fungiert es als Transkriptionsfaktor, während im phosphorylierten Zustand die Replikation begünstigt abläuft.

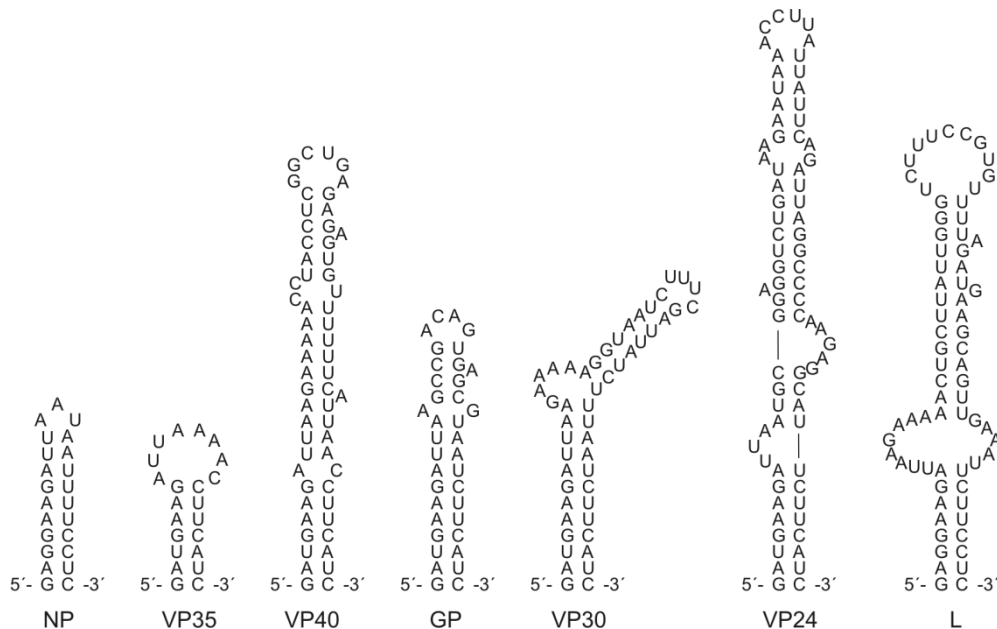


Abb. 10 Vorhersagen von mRNA-Sekundärstrukturen an ihrem 5'-Ende. Laut Vorhersage der Strukturen und ΔG -Werte (hier mittels *RNAfold*; s. Kap. 2.11.4) können sich potenzielle RNA-Sekundärstrukturen am 5'-Ende jeder mRNA ausbilden; das Startnukleotid der mRNAs ist stets am ersten Nukleotid der hier gezeigten Haarnadeln annotiert.

Die Strukturen tendieren dazu stabiler zu werden: ΔG (NP): -10.30 kcal/mol; ΔG (VP35): -8.70 kcal/mol; ΔG (VP40): -18.80 kcal/mol; ΔG (GP): -15.70 kcal/mol; ΔG (VP30): -19.90 kcal/mol; ΔG (VP24): -29.10 kcal/mol; ΔG (L): -21.90 kcal/mol (nach [85]).

Es konnte gezeigt werden, dass eine stabile Haarnadelstruktur am Start der ersten mRNA eine wichtige Rolle bei der VP30-abhängigen Regulation der Transkription spielt (s. Kap. 1.3.2 und Abb. 10). Interessanterweise wurden auch für alle anderen mRNAs 5'-terminale Sekundärstrukturen mit der Tendenz steigender thermodynamischer Stabilitäten von der ersten (NP) bis hin zu letzten (L) mRNA vorhergesagt (s. Abb. 10; [85]), deren *in vivo*-Existenz und Funktion bisher nicht abschließend geklärt wurde.

1.3 Das virale Protein 30

1.3.1 Funktionen und Domänen

Das virale Protein 30 besteht aus 288 Aminosäuren und wurde aufgrund seines Molekulargewichtes von etwa 30 kDa VP30 genannt. Wie auch die anderen viralen Proteine besitzt es vielseitige Funktionen und Domänen.

Im N-terminalen Bereich befinden sich zwei Serin-Cluster (aa S29/S30/S31 und aa S42/S44/S46) und ein Arginin-Cluster (aa R26/R28/R32/R36/R40/R43), die miteinander überlappen (s. Abb. 11). Es konnte gezeigt werden, dass die Serin-Cluster phosphoryliert werden und VP30 über diesen Mechanismus in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor reguliert wird ([86,87,88]; s. Kap. 1.3.2). So kann VP30 nur im dephosphorylierten Zustand mit VP35 interagieren, um die Transkription zu aktivieren [88]. Das Protein besitzt zudem ein unkonventionelles Zinkfinger-Motiv (Cys₃-His), das neben dem genannten Arginin-Cluster mit der Fähigkeit von VP30 RNA zu binden in Verbindung gebracht wurde [89,90].

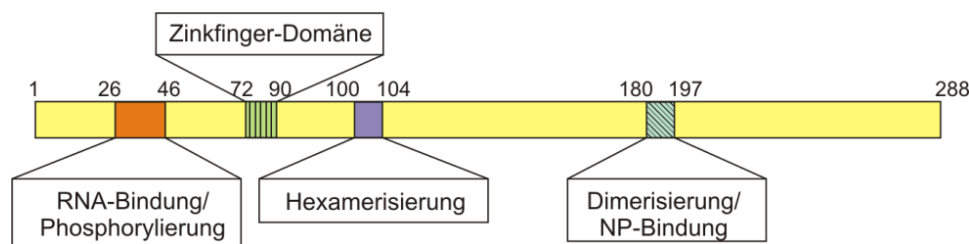


Abb. 11 Übersicht über Funktionen und Domänen von VP30. Im N-terminalen Bereich des Proteins befinden sich zwei Serin-Cluster, die maßgeblich an der Phosphorylierung beteiligt sind, sowie ein damit überlappendes Arginin-Cluster, das in die RNA-Bindung involviert ist (aa 26-46; orange). Zudem besitzt VP30 ein Zinkfinger-Motiv (aa 72-90; grün). Die Aminosäuren 100-104 beinhalten die Hexamerisierungsdomäne, deren zentrales Merkmal ein Tetraleucin-Motiv (violett) ist. Ein basisches Cluster im C-proximalen Bereich ist für die Dimerisierung von VP30 sowie die Interaktion mit NP verantwortlich (blau).

VP30 dimerisiert über ein basisches Aminosäure-Cluster im C-proximalen Bereich des Proteins (aa 179/180/183), wobei sich jeweils drei Dimere zu einem Hexamer zusammenlagern, was wiederum über das Tetraleucin-Motiv (aa 100-103) der Hexamerisierungsdomäne vermittelt wird (s. Abb. 11; [91,107]). Die Hexamerisierung von VP30 ist Voraussetzung für die Funktion als Transkriptionsfaktor [91].

Die C-terminale Domäne ist außerdem für die Interaktion zwischen VP30 und NP verantwortlich und scheint über weitere regulatorische Phosphorylierungsstellen ebenfalls einen Beitrag zum Phosphorylierungszustand von VP30 zu leisten [92,107].

Zusammen mit VP35 und VP40 konnte VP30 als *suppressor of RNA silencing (SRS)* identifiziert werden, d.h. alle drei viralen Proteine tragen zur Supprimierung der RNAi-Maschinerie des Wirtsorganismus bei [33]. Zusätzlich wurde das RNA-editing der GP mRNA mit VP30 in Verbindung gebracht [93].

1.3.2 VP30 als essenzieller Transkriptionsfaktor

Die Bedeutung des Phosphorylierungsstatus von VP30 für seine Funktion als Transkriptionsaktivator konnte anhand einer Mutante gezeigt werden, bei der die sechs Serine der beiden Serin-Cluster mit Alaninen ersetzt wurden, um einen permanent dephosphorylierten Status zu imitieren. Diese Mutante, VP30_AA genannt, aktiviert die Transkription vergleichbar bzw. effizienter als das Wildtyp-Protein [86,87,88]. Ist VP30

dagegen phosphoryliert, was durch die Einführung von Aspartaten anstelle der Serine (genannt: VP30_DD) simuliert wurde, findet keine detektierbare Transkription mehr statt, sondern bevorzugt Replikation des viralen Genoms (s. Abb. 9; [88]).

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass auch die Interaktion von VP30 mit VP35 bzw. NP vom Phosphorylierungsstatus abhängt: so interagiert VP30 im dephosphorylierten Zustand mit VP35, nicht aber mit NP, während phosphomimetisches VP30 ausschließlich mit NP wechselwirkt. Diese wechselseitig exklusiven Interaktionen deuten darauf hin, dass VP30 den Transkriptions- bzw. Replikationsmodus und damit auch den Aufbau des Polymerase-Komplexes reguliert [88].

Die Abhängigkeit der viralen Transkription von VP30 konnte noch weiter konkretisiert werden, indem die Haarnadelstruktur am 5'-Ende der ersten mRNA (NP) genauer untersucht wurde. Wurden in diese Haarnadelstruktur Mutationen eingebracht, die zur Schwächung der 5'-terminalen Haarnadelstruktur der NP-mRNA führte, konnte die stringente Abhängigkeit der Transkription von VP30 aufgehoben werden. D.h. die Transkription erfolgte in diesem Kontext auch in Abwesenheit von VP30. Eine solche Abhängigkeit konnte für die zweite Haarnadelstruktur (am 5'-Ende der mRNA für VP35) nicht gezeigt werden [94]. Dennoch scheint VP30 auch für die Reinitiation der Transkription an den internen Genen essenziell zu sein [95].

1.3.3 VP30 im Vergleich zu M2-1 (RSV)

Den Proteinen des Ebolavirus können funktionelle Homologe in anderen Viren der Ordnung *Mononegavirales* zugeordnet werden: zum Beispiel das Nukleoprotein (NP), die RNA-abhängige RNA-Polymerase (L) und das Phosphoprotein (P) als Polymerase-Kofaktor (P als Pendant zu VP35) [96]. Eine Ausnahme bildet hier VP30, das den besonderen Transkriptionsmechanismus des Ebolavirus reguliert. Das einzige Protein, das in vielerlei Hinsicht Ähnlichkeiten zu VP30 aufweist, ist M2-1 des Respiratorischen Synzytial-Virus (RSV). Es fungiert als Antiterminator und ist damit ebenso wie VP30 für die vollständige Synthese der viralen mRNAs notwendig, während es für die Replikation des Genoms nicht essenziell ist [97,98,99]. Es besitzt ein zu VP30 analoges Zinkfinger-Motiv (Cys₃-His) und ist ebenfalls in der Lage RNA zu binden, wobei die Spezifität lange Zeit diskutiert wurde [100,101]. Neuere Studien konnten jedoch eine Präferenz von M2-1 für Poly(A)-RNA zeigen, was die Sichtweise einer Funktion als Antiterminations-Protein bestärkt [102,103,104]. Die nachgewiesene Interaktion zwischen M2-1 und P könnte der zwischen VP30 und VP35 entsprechen [88,105].

Auch strukturell zeigt M2-1 eine große Ähnlichkeit zur C-Domäne von VP30, obwohl sich das in keiner signifikanten Sequenzkonservierung zwischen den beiden Proteinen manifestiert (s. Abb. 12).

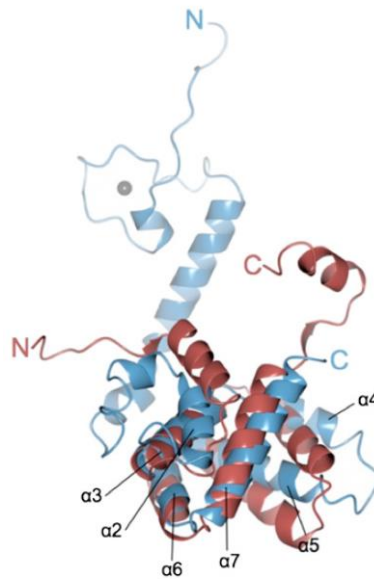


Abb. 12 Überlagerung der Struktur von M2-1 (Volllänge; blau) mit der C-terminalen Domäne von VP30 (rot) (entnommen aus [103]).

Neben den zahlreichen Gemeinsamkeiten gibt es jedoch auch Unterschiede zwischen M2-1 und VP30. Die funktionellen Regionen für RNA-Bindung und Phosphorylierung sind in den beiden Proteinen unterschiedlich lokalisiert. M2-1 oligomerisiert zu einem Tetramer, während VP30 als Hexamer vorliegt [106,107]. Zusätzlich konnten mechanistische Unterschiede aufgezeigt werden. Zwar wird auch im Fall von M2-1 die Transkription über den Phosphorylierungsstatus reguliert, jedoch konnte sowohl für eine simulierte Phosphorylierung als auch Dephosphorylierung ein stark negativer Effekt auf die Transkriptionseffizienz gezeigt werden. Diese Daten deuteten darauf hin, dass M2-1 eine dynamische Phosphorylierung benötigt, um seine Funktion als Transkriptionsfaktor zu erfüllen [103].

1.4 Fragestellung

Transkription und Replikation des viralen Genoms gehören zu den grundlegenden Prozessen der Virusvermehrung. Im Fall des Ebolavirus werden für die Transkription vier der viralen Proteine benötigt: die Polymerase L, der Polymerase-Kofaktor VP35, das Nukleoprotein NP sowie der Transkriptionsfaktor VP30 (dephosphoryliert). Die Replikation dagegen hängt nicht direkt von der Beteiligung von VP30 ab, das in diesem Fall phosphoryliert vorliegt und nicht mehr Teil des Polymerasekomplexes zu sein scheint (s. Abb. 13).

Die Rolle von VP30 als Transkriptionsfaktor und seine Regulation über Phosphorylierung war bereits Gegenstand einiger Studien [87,88,92,95]. Dennoch ist bisher nicht vollständig

geklärt, was die Konsequenzen der Phosphorylierung von VP30 auf molekularer Ebene sind. Zudem ist die Rolle der Haarnadelstrukturen am 5'-Ende der mRNAs bisher nicht oder nicht vollständig verstanden.

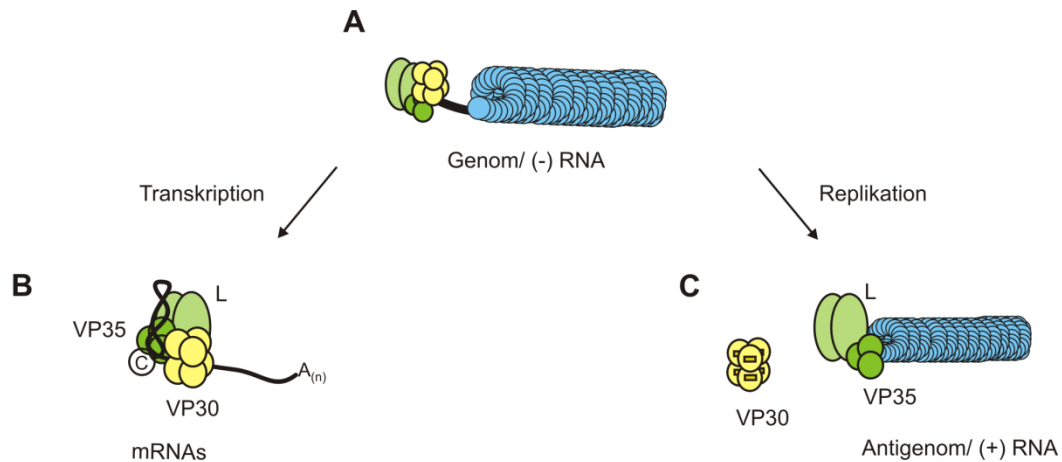


Abb. 13 Schematische Übersicht zur Fragestellung dieser Arbeit. (A) Zur Vermehrung des Virus ist der Polymerasekomplex (bestehend aus L, VP30, VP35 und NP) essenziell. Er nutzt das Genom als Templat für Transkription (B) und Replikation (C). (B) Bei der Transkription ist der Transkriptionskomplex (L, VP35, VP30 und NP) für die Synthese der viralen mRNAs notwendig; hierbei spielt der Phosphorylierungsstatus von VP30 eine entscheidende Rolle, da es für die Aktivierung der Transkription dephosphoryliert vorliegen muss. (C) Bei der Replikation liegt VP30 phosphoryliert vor und verliert seine Interaktion zu VP35 und damit zum Polymerasekomplex; die Synthese des Antigenoms findet demnach ohne direkte Beteiligung von VP30 statt.

Darauf basierend war das zentrale Thema dieser Arbeit die transkriptionelle Regulation von VP30 im Hinblick auf dessen RNA-Bindungseigenschaften zu untersuchen, wobei sich hieraus vier Teilprojekte ergaben, auf die im Folgenden genauer eingegangen werden soll.

1.4.1 Teilprojekt 1: Etablierung eines Bindungsassays (EMSA) zur Detektion von RNA:VP30-Komplexen

Um die RNA-Bindung von VP30 untersuchen zu können, stand zunächst die Entwicklung eines Assays zu Darstellung und Quantifizierung von RNA:VP30-Komplexen im Vordergrund. Ziel war es dabei, die Untersuchungen der RNA:VP30-Bindung auf Basis eines *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) durchzuführen, da es mit einem solchen Verfahren möglich ist, verschiedene Komplexarten voneinander zu unterscheiden und die Untersuchungen unter nativen Bedingungen durchzuführen.

Hierfür sollte zunächst eine bindungskompetente RNA identifiziert und die physiologische Funktionalität der verwendeten rekombinanten VP30-Varianten überprüft werden. Anschließend sollte der Einfluss unterschiedlicher Aufreinigungsprotokolle sowie des MBP-tags des VP30-Fusionsproteins untersucht werden. Zudem sollten die Bedingungen des EMSA so modifiziert werden, dass über die Detektion und Quantifizierung von RNA:VP30-Komplexen apparente K_d -Bestimmungen durchgeführt werden konnten.

1.4.2 Teilprojekt 2: *In vitro* Charakterisierung der RNA-Bindungsaktivität von VP30

Im Rahmen dieses Teilprojektes sollten die RNA-Bindungseigenschaften von VP30 (Wildtyp) *in vitro* charakterisiert werden. In der Literatur wurde die RNA-Bindung von VP30 bisher nur im Rahmen einer Studie von John *et al.* mittels Filter-Bindungsassay und UV-crosslinking untersucht. Die wenigen dabei verwendeten Substrate waren 25 bis 40 Nukleotide lang und dem *leader*-Bereich (genomisch und antigenomisch) des Ebolavirus-Genoms entnommen. Als Ergebnis wurde für VP30 eine Ebolavirus-spezifische Bindung an Substrate mit Haarnadelstruktur (nt 56-78) und einzelsträngiger 5'- bzw. 3'-Extension postuliert, wobei keine apparenten K_d -Werte bestimmt, sondern Absolutsignale für die Beurteilung der Bindungsaffinität herangezogen wurden [90].

Ausgehend von diesen Daten sollte die RNA-Bindung detaillierter charakterisiert werden, um die Substratspezifität von VP30 besser zu verstehen.

In einem ersten Schritt sollten die potenziellen RNA-Strukturelemente auf Genom- und Antigenomebene (ca. 150 Nukleotide) mittels Strukturvorhersage und experimenteller Verifizierung analysiert werden.

Verschiedene RNA-Substrate sollten anschließend über *in vitro* T7-Transkription hergestellt und die Affinität von VP30 zu diesen Substraten ermittelt werden. Ziel war es hierbei (i) sequenzielle und strukturelle Präferenzen sowie (ii) mögliche Affinitätsunterschiede bei Ebolavirus-spezifischen Substraten (z.B. Genom vs. Antigenom; s. Abb. 13 A vs. B) zu identifizieren. Ein besonderes Augenmerk lag hierbei auf den Haarnadelstrukturen am Transkriptionsstart des ersten Gens (NP), sowohl auf (-) als auch (+) RNA-Ebene. Die zentrale Rolle dieser Region für die VP30-Abhängigkeit der Transkription wurde wie bereits erwähnt in einer früheren Studie gezeigt [86].

1.4.3 Teilprojekt 3: Zusammenhang zwischen transkriptioneller Regulation und RNA-Bindefähigkeit von VP30

Bisher konnte kein Zusammenhang zwischen der transkriptionellen Regulation und RNA-Bindefähigkeit von VP30 gezeigt werden. Für das verwandte M2-1 des RS-Virus konnte dagegen eine solche Korrelation kürzlich nachgewiesen werden, da M2-1-Varianten, bei denen Aminosäuren mutiert wurden, die nachweislich in die RNA-Bindung involviert sind, auch einen transkriptionellen Phänotyp zeigten [103].

Ziel dieses Teilprojekts war daher die Klärung der Frage, inwieweit die RNA-Bindefähigkeit von VP30 mit der transkriptionsaktivierenden Eigenschaft des Proteins korreliert ist. Dazu sollten alle literaturbekannten VP30-Mutanten, die einen Effekt in der Transkriptionsaktivierung gezeigt haben, rekombinant hergestellt und auf ihre RNA-Bindungsfähigkeit getestet werden. Zudem sollte das Arginin-reiche putative RNA-Bindungsmotiv genauer untersucht werden, da für entsprechend mutierte VP30-Proteine

zwar Effekte auf die RNA-Bindungsaffinität nachgewiesen wurden, aber eine Transkriptionsaktivierung in zellulären Modellsystemen bisher nicht adressiert wurde. Schließlich sollte untersucht werden, inwieweit die Anwesenheit von RNA für die VP30:VP35-Interaktion sowie für die Oligomerisierung von VP30 und VP35 notwendig ist.

1.4.4 Teilprojekt 4: Transkriptomanalyse zum Verständnis der transkriptionellen Regulation durch VP30

Der genaue Mechanismus der Transkriptionsregulation durch VP30 wurde bisher nicht verstanden. Da es für das filovirale System keine *in vitro* Transkriptions-Modellsysteme zur Untersuchung mechanistischer Fragestellungen gibt, wurde in diesem Teilprojekt der Ansatz verfolgt, das virale Transkriptom über *Next Generation Sequencing* (NGS) zu analysieren.

Dazu sollte zunächst Gesamt-RNA aus humanen Zellen isoliert werden, die mit Ebolaviren infiziert wurden. In einem zweiten Ansatz sollte dann unter Verwendung von Ebolavirus-Minigenomsystemen der Einfluss der Präsenz von VP30 auf die Transkription einer Templat-RNA untersucht werden, die Mutationen im Bereich der initialen Transkriptionsstartregion besitzt. Diese sogenannte *NheI*-Mutante (die Mutationen erzeugen bei der Klonierung auf DNA-Ebene eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *NheI*) führt zu einer Schwächung insbesondere der Haarnadelstruktur am 5'-Ende des NP-mRNA-Transkripts (nt 56-78). Es wurde berichtet, dass bei dieser *NheI*-Mutante die VP30-Abhängigkeit aufgehoben ist, d.h. Transkription auch in Abwesenheit von VP30 stattfindet [94]. Minigenome mit Wildtyp- und *NheI*-mutierter Sequenz in der Transkriptionsstartregion sollten dann in Zellen transfiziert werden, die VP30 exprimieren bzw. nicht exprimieren, um mittels der anschließenden Transkriptom (RNA-Seq)-Analyse einen detaillierten Einblick in die Transkription und ihre Regulation durch VP30 zu erhalten.

2 Material und Methoden

2.1 Puffer, Medien und Stammlösungen

Alle verwendeten Puffer, Medien und Stammlösungen werden in den entsprechenden Kapiteln aufgelistet. Die Puffer wurden, wenn nicht anders angegeben, mit doppeltdestilliertem Wasser (ddH₂O) angesetzt. Im Fall der Nährmedien für die bakterielle Zellkultur, wurde demineralisiertes Wasser (dest. H₂O) verwendet und anschließend autoklaviert (121 °C, 2.0 bar, 15 min).

2.2 Plasmide

Im Folgenden werden die verschiedenen Plasmide aufgelistet, die (i) als Grundlage einer *in vitro* T7-Transkription (s. 2.2.1), (ii) als Expressionsplasmide für die Herstellung der verschiedenen Proteine (s. 2.2.2 und 2.2.3) und (iii) zur Synthese von Minigenom-Varianten hergestellt bzw. verwendet wurden (s. 2.2.4).

2.2.1 pUC19-Vektor

Der pUC19-Vektor wurde als Basis verschiedener T7-Transkriptionskassetten verwendet. Als Selektionsmarker ist eine Ampicillin-Resistenz kodiert. In der folgenden Tabelle (Tab. 1) werden die hergestellten Plasmide mit den darin enthaltenen T7-Transkriptionskassetten aufgelistet, einschließlich der für die Herstellung relevanten Oligonukleotide (sogenannte *Primer*).

Tab. 1 Übersicht über die verschiedenen Vektoren als Template für *in vitro* T7-Transkriptionen.

Bezeichnung	Verwendung	hergestellt/erhalten von	Primer ^[1]
pUC19_T7_154-1	(-) RNA nt 1-154	Julia Schlereth, AG Hartmann	3;4
pUC19_T7_154-1_HH	(-) RNA nt 1-154	Julia Schlereth, AG Hartmann	7;8
pUC19_T7_154-1_NheI	(-) RNA nt 1-154 mit NheI-Mutation	Julia Schlereth, AG Hartmann	35;36
pUC19_T7_154-1_Δstem	(-) RNA nt 1-154 mit mutierter Stamm-Region	Julia Schlereth, AG Hartmann	16;17
pUC19_T7_154-55	(-) RNA nt 55-154	Julia Schlereth, AG Hartmann	9;15
pUC19_T7_154-79	(-) RNA nt 79-154	Julia Schlereth, AG Hartmann	9;25
pUC19_T7_154-113	(-) RNA nt 113-154	Julia Schlereth, AG Hartmann	27;28
pUC19_T7_118-1	(-) RNA nt 1-118	Julia Schlereth, AG Hartmann	22;13

Bezeichnung	Verwendung	hergestellt/erhalten von	Primer ^[1]
pUC19_T7_80-1	(-) RNA nt 1-80	Julia Schlereth, AG Hartmann	14;13
pUC19_T7_45-1	(-) RNA nt 1-45	Julia Schlereth, AG Hartmann	26;13
pUC19_T7_2-158	(+) RNA nt 2-158	Julia Schlereth, AG Hartmann	1;2
pUC19_T7_2-158_HH	(+) RNA nt 2-158	Julia Schlereth, AG Hartmann	5;6
pUC19_T7_2-158_NheI	(+) RNA nt 2-158 mit NheI-Mutation	Julia Schlereth, AG Hartmann	37;38
pUC19_T7_2-158_Δstem	(+) RNA nt 2-158 mit mutierter Stamm-Region	Julia Schlereth, AG Hartmann	19;20
pUC19_T7_2-120	(+) RNA nt 2-120	Julia Schlereth, AG Hartmann	9;11
pUC19_T7_2-78	(+) RNA nt 2-78	Julia Schlereth, AG Hartmann	9;18
pUC19_T7_56-158	(+) RNA nt 56-158	Julia Schlereth, AG Hartmann	12;13
pUC19_T7_79-158	(+) RNA nt 79-158	Julia Schlereth, AG Hartmann	21;13
pUC19_T7_(+)154-79	(-) RNA nt 79-154 mit (+) Haarnadelstruktur	Julia Schlereth, AG Hartmann	31;32
pUC19_T7_(-)79-158	(+) RNA nt 79-158 mit (-) Haarnadelstruktur	Julia Schlereth, AG Hartmann	33;34
pUC19_T7_ctailer	(+) RNA <i>trailer</i> Region (179 nt)	Julia Schlereth, AG Hartmann	39;40
pUC19_T7_RybB	RybB (Hfq-Substrat)	Julia Schlereth, AG Hartmann	23;24

[1] die zugehörigen Sequenzen sind im Anhang gelistet.

2.2.2 pBADM41-Vektor

Der pBADM41-Vektor wurde für die rekombinante Herstellung von VP30 (aa 8-272) und dessen verschiedener Varianten verwendet. Sie wurden als MBP-Fusionsproteine produziert und enthalten zusätzlich einen N-terminalen His₆-tag. Zwischen MBP und VP30 befindet sich eine Erkennungssequenz für die TEV (*Tobacco Etch Virus*) Protease, wodurch der MBP-tag von VP30 abgespalten werden kann.

Außerdem ist eine Ampicillin-Resistenz kodiert, die als Selektionsmarker verwendet wurde. Folgende Abbildung zeigt die Plasmidkarte von pBADM41_VP30 aa 8-272, wobei die kodierende Sequenz von VP30 über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *NotI* eingebracht wurde (s. Abb. 14). Die Regulation der Proteinexpression erfolgt bei diesem Vektor über ein Arabinose-Operon, auf dem Plasmid ist demnach das Repressorprotein AraC kodiert. Die Proteinexpression kann über Zugabe von Arabinose induziert werden.

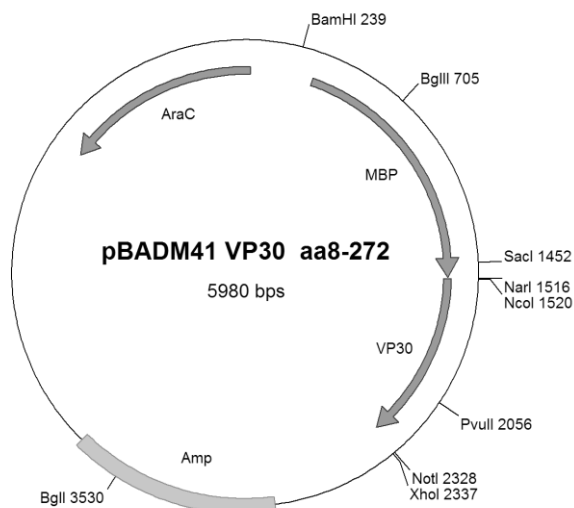


Abb. 14 Plasmidkarte von pBADM41 VP30 aa 8-272. Das Plasmid enthält eine Expressionskassette VP30 (aa 8-272) mit N-terminalem MBP-tag. Zwischen MBP und VP30 befindet sich eine Erkennungssequenz für die TEV Protease. Als Selektionsmarker kann Ampicillin verwendet werden. Die Regulation erfolgt mit Hilfe eines Arabinose-Operons, von dem das Protein AraC ein wichtiger Bestandteil ist.

In der folgenden Übersicht werden alle verwendeten pBADM41-Plasmide aufgelistet (s. Tab. 2).

Tab. 2 Übersicht über die verwendeten pBADM41-Vektoren zur Herstellung von VP30-Wildtyp und Varianten.

Bezeichnung	Verwendung	hergestellt/erhalten von	Primer ^[1]
pBADM_VP30 ₈₋₂₇₂	MBP-VP30	Nadine Biedenkopf, AG Becker	
pBAD_His_VP30 ₈₋₂₇₂	His ₆ -VP30	Nadine Biedenkopf, AG Becker	
pBADM_VP30 ₈₋₂₇₂ _AA	MBP-VP30_AA	Nadine Biedenkopf, AG Becker	
pBADM_VP30 ₈₋₂₇₂ _DD	MBP-VP30_DD	Nadine Biedenkopf, AG Becker	
pBADM_VP30 ₈₋₂₇₂ _3LA	MBP-VP30_3LA	Nadine Biedenkopf, AG Becker	
pBADM_VP30 ₈₋₂₇₂ _5LA	MBP-VP30_5LA	Nadine Biedenkopf, AG Becker	
pBADM_VP30 ₈₋₂₇₂ _R26A	MBP-VP30_R26A	Nadine Biedenkopf, AG Becker	
pBADM_VP30 ₈₋₂₇₂ _R28A	MBP-VP30_R28A	Nadine Biedenkopf, AG Becker	
pBADM_VP30 ₈₋₂₇₂ _R40A	MBP-VP30_R40A	Nadine Biedenkopf, AG Becker	
pBADM_VP30 ₈₋₂₇₂ _3RA	MBP-VP30_3RA	Nadine Biedenkopf, AG Becker	
pBADM_VP30 ₈₋₂₇₂ _C72S	MBP-VP30_C72S	Julia Schlereth, AG Hartmann	43;44
pBADM_VP30 ₈₋₂₇₂ _3RA_C72S	MBP-VP30_3RA_C72S	Julia Schlereth, AG Hartmann	43;44

[1] die zugehörigen Sequenzen sind im Anhang gelistet.

2.2.3 pProEx-Vektor

Der pProEx-Vektor wurde zur rekombinanten Herstellung der C-terminalen Domäne von VP30 (VP30_{CTD}; aa 142-272) verwendet und von der Arbeitsgruppe Prof. Becker (Institut für Virologie, Universität Marburg) bereitgestellt. Als Selektionsmarker ist eine Ampicillin-Resistenzkassette enthalten.

2.2.4 APP 356 (p3E-5ERLuc)-Vektor

Dieser Vektor (das so genannte Minigenom-Plasmid) wurde für Experimente mit dem trVLP (*t*ranscription and *r*eplication competent *v*irus *l*ike *p*article)-System verwendet.

Folgende Abbildung zeigt die Vektorkarte des Wildtyp-Minigenoms. Es beinhaltet die erweiterte *leader*- (nt 1-472) sowie *trailer*-Region des Ebolavirus-Genoms, wobei die ORFs (engl. *open reading frames*; offene Leserahmen) der verschiedenen viralen Proteine durch ein Gen, das für die Renilla-Luziferase (Rluc) kodiert, ersetzt wurden. Die Herstellung des Minigenoms steht unter Kontrolle eines T7-Promotors. Zusätzlich ist auf dem Plasmid eine Resistenz gegenüber Ampicillin kodiert (s. Abb. 15).

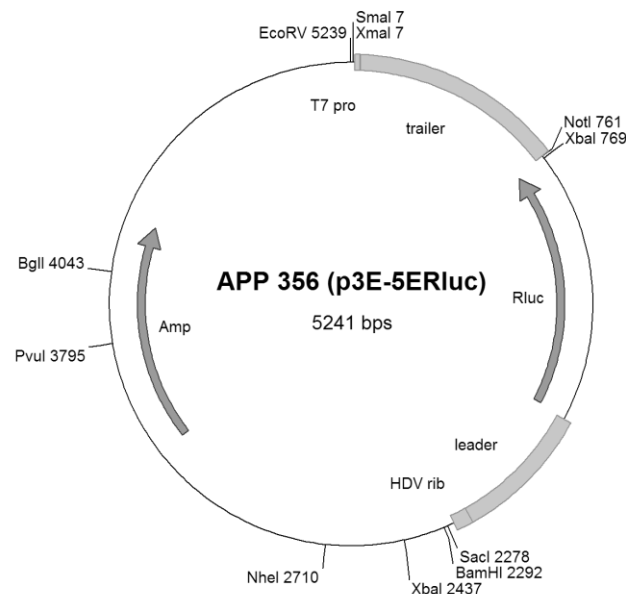


Abb. 15 Plasmidkarte des APP 356 (p3E-5ERLuc)-Vektors. Dieses Minigenom-Plasmid wurde im trVLP-Assay verwendet und kodiert für die erweiterte *leader*- (nt 1-472) und *trailer*-Region des Ebolavirus-Genoms (unter Kontrolle eines T7-Promotors; T7 pro). Dazwischen ist (anstelle der Gene für die viralen Proteine) eine Renilla-Luziferase (Rluc) kodiert. Das Plasmid trägt eine Ampicillin-Resistenz (Amp).

In der folgenden Tabelle werden die verschiedenen Minigenom-Varianten gelistet (s. Tab. 3).

Tab. 3 Übersicht über die verschiedenen Minigenom-Plasmide.

Bezeichnung	Verwendung	hergestellt/erhalten von	Primer ^[1]
p3E-5ERluc	EBOV Minigenom	Nadine Biedenkopf, AG Becker	
p3E-5ERluc_dtrl	Replikations-defizientes EBOV Minigenom	Nadine Biedenkopf, AG Becker	
p3E-5ERluc_NheI	EBOV Minigenom mit <i>NheI</i> -Mutation	Julia Schlereth, AG Hartmann	35;36
p3E-5ERluc_dtrl_NheI	replikations-defizientes EBOV Minigenom mit <i>NheI</i> -Mutation	Julia Schlereth, AG Hartmann	35;36

[1] die zugehörigen Sequenzen sind im Anhang gelistet.

2.3 Oligonukleotide

2.3.1 DNA-Oligonukleotide

2.3.1.1 DNA-Oligonukleotide zur Klonierung

Die zur Herstellung der verschiedenen Plasmide verwendeten Oligonukleotide (sogenannte *Primer*) finden sich detailliert aufgelistet im Anhang.

2.3.1.2 DNA-Oligonukleotide zur Sequenzierung

Die Sequenzierungen der Plasmide wurden bei *eurofins genomics* (MWG) durchgeführt. Zur Sequenzierung der T7-Transkriptionskassetten (pUC19-Vektoren) wurde ein Standardprimer von *eurofins genomics* verwendet (Bezeichnung: M13 rev (-49); Sequenz: 5'-GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG -3').

Zur Sequenzierung der VP30-Expressionsplasmide (pBADM41-Vektoren) wurden folgende *Primer* verwendet (s. Tab. 4).

Tab. 4 *Primer* zur Sequenzierung der verschiedenen pBADM41-Plasmide.

Bezeichnung	Sequenz
pBADM_VP30 fwd	5'-AAT CGC CCG TAA GAC TTG TG-3'
pBADM_VP30 rev	5'-TTC TGC CGT CTT GAT CAG TG-3'

Die Sequenzierung der APP 356 (p3E-5ERluc)-Konstrukte erfolgte ebenfalls unter Verwendung eines spezifischen *Primers* (Bezeichnung: SeqPrimer p3E5E; Sequenz: 5'-GGT TGT TCT CTA TCT TTG TGA TGT GG-3').

2.3.1.3 DNA-Oligonukleotide als Hybridisierungssonden

DNA-Oligonukleotide wurden unter anderem dazu verwendet, um sie an die genomische virale RNA (nt 154-1) zu hybridisieren und damit Bindungsstudien durchzuführen. In der folgenden Tabelle sind die Sequenzen der verwendeten Sonden gelistet (s. Tab. 5).

Tab. 5 Übersicht über die verwendeten DNA-Oligonukleotide als Sonden.

Bezeichnung	Sequenz
Kontroll-Sonde	5'-AAT TTA AAT TGA AAT TGT-3'
Sonde 1	5'-GGA TCT TTT GTG TGC GAA-3'
Sonde 2	5'-ATT GAA ATT TAT ATC GG-3'
Sonde 3	5'-AAT TTA AAT TGA AAT TGT TAC-3'
Sonde 4	5'-CCT GGT TTG TTT CAG AG-3'

2.3.1.4 DNA-Oligonukleotide als Substrate

Zur Untersuchung der VP30:Nukleinsäuren-Interaktion wurden unter anderem DNA-Substrate verwendet, die von *metabion* bezogen wurden. In der folgenden Tabelle sind diese Substrate zusammengestellt (s. Tab. 6).

Tab. 6 DNA-Oligonukleotide als Bindungspartner für VP30.

Bezeichnung	Sequenz
42 nt DNA CT-reich	5'-GGA TTT TCC CTT TCC CAT TTT CCC TTT CCC ATT TTC CCT TTC-3'
37 nt DNA GA repeat	5'-GGA GAG AGA GAG AGA GAG GAG AGA GAG AGA GAG AGA G-3'
37 nt DNA poly(A)	5'-AAA AAA AAA AAA AAA AAA GAA AAA AAA AAA AAA AAA A-3'

2.3.1.5 DNA-Oligonukleotide zur cDNA-Synthese

Für die Synthese von komplementärer DNA (cDNA) auf Basis von Gesamt-RNA aus Ebolavirus-infizierten Zellen wurden für die verschiedenen RNA-Spezies unterschiedliche DNA-Oligonukleotide zur reversen Transkription verwendet (s. Tab. 7).

Tab. 7 DNA-Oligonukleotide zur cDNA-Synthese.

Bezeichnung	Sequenz
RT_leader	5'-ATC TTC CTC ATA GTT ATT CGC ACA CA-3'
RT_mRNA	5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTC TTA ATT ATA AAA CG-3'
R_replikativ	5'-CAA ACC AGG TGT GAT TAC AGT AAC AAT T-3'

2.3.1.6 DNA-Oligonukleotide für die quantitative PCR

Um die verschiedenen viralen RNA-Spezies über quantitative PCR nachzuweisen, wurde auf Basis der synthetisierten cDNA eine quantitative PCR durchgeführt. Hierfür wurden drei verschiedene *Primer*-Paare eingesetzt, die in folgenden Tabellen zusammengefasst werden (s. Tab. 7-9).

Tab. 8 Übersicht über die Bezeichnungen der verwendeten *Primer*-Paare der RT-qPCR.

Bezeichnung	<i>Primer forward</i> *	<i>Primer reverse</i> **
Primerset <i>leader</i>	qPCR <i>leader forward</i>	RT_ <i>leader</i>
Primerset mRNA	qPCR <i>mRNA forward</i>	RT_mRNA
Primerset replikativ	qPCR <i>leader forward</i>	RT_replikativ

* Sequenz s. Tab. 7; ** Sequenz s. Tab. 9

Tab. 9 Verwendete Oligonukleotide zur RT-qPCR (*forward Primer*).

Bezeichnung	Sequenz <i>Primer forward</i>
qPCR <i>leader forward</i>	5'-GCC GGA CAC ACA AAA AGA AAG AA -3'
qPCR mRNA <i>forward</i>	5'-GTA ACT CAA TAT TCT AAC TAG CGA TTT ATC TAA ATT AAA TTA CA -3'

2.3.2 RNA-Oligonukleotide

Die verschiedenen RNA-Oligonukleotide, die zur Untersuchung der VP30:RNA-Interaktion verwendet wurden, wurden i.d.R. über eine *in vitro* T7-Transkription hergestellt (s. Kap. 2.7.1). Einige kurze RNAs wurden von *Integrated DNA Technologies* (IDT) bezogen und werden in der folgenden Tabelle aufgelistet (s. Tab. 10).

Tab. 10 Übersicht über die kommerziell bezogenen RNA-Substrate.

Bezeichnung	Sequenz
14 nt CU-reich	5'-GGA UUU UCC CUU UC-3'
28 nt CU-reich	5'-GGA UUU UCC CUU UCC CAU UUU CCC UUU C-3'
33 nt CU-reich	5'-GGA UUU UCC CUU UCC CAU UUU CCC UUU UCG UCC-3'
37 nt CU-reich	5'-GGA UUU UCC CUU UCC CAU UUU CCC UUU UCG UCC GGU C-3'
42 nt CU-reich	5'-GGA UUU UCC CUU UCC CAU UUU CCC UUU CCC AUU UUC CCU UUC-3'
37 nt GA-reich	5'-CCU AAA AGG GAA AGG GUA AAA GGG AAA AGC AGG CCA G-3'
37 nt GA repeat	5'-GGA GAG AGA GAG AGA GAG GAG AGA GAG AGA GAG AGA G-3'
37 nt poly(A)	5'-AAA AAA AAA AAA AAA AAA GAA AAA AAA AAA AAA A-3'
37 nt poly(C)	5'-CCC CCC CCC CCC CCC CCC UCC CCC CCC CCC CCC C-3'
37 nt poly(U)	5'-UUU UUU UUU UUU UUU UUU CUU UUU UUU UUU UUU U-3'

2.4 Bakterielle Zellkultur

2.4.1 Bakterienstämme

2.4.1.1 *E. coli* DH5 α

Genotyp: F- Φ 80/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rk-, mk+) *phoA supE44* λ - *thi-1 gyrA96 relA1*

Aufgrund ihrer hohen Plasmidreplikationsrate wurden für die Vervielfältigung und Präparation von Plasmiden chemisch-kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen verwendet.

2.4.1.2 *E. coli* BL21 (DE3) und *E. coli* BL21 (DE3) pLysS

Genotyp: *E. coli* B F- *dcm ompT hsdS*(rB- mB-) *gal* λ (DE3) bzw.
E. coli B F- *dcm ompT hsdS*(rB- mB-) *gal* λ (DE3)[pLysS Cam^r]

Die *E. coli* BL21 Stämme wurden besonders für die Anwendung der heterologen Genexpression und damit zur rekombinanten Herstellung von Proteinen entwickelt. Bei nicht-toxischen Proteinen eignet sich der *E. coli* BL21 (DE3)-Stamm aufgrund seiner besonders hohen Expressionslevel. Dieser Stamm wurde für die Herstellung des MBP-VP30 Wildtyps verwendet. Für die verschiedenen VP30-Varianten wurden *E. coli* BL21 (DE3) pLysS Zellen genutzt, da diese aufgrund ihrer signifikant niedrigeren basalen Expression heterologer Gene für diese Proteinvarianten eine effizientere Expression zeigten. Das pLysS-Plasmid vermittelt eine Chloramphenicol-Resistenz.

2.4.1.3 *E. coli* Rosetta (DE3)

Genotyp: F- *ompT hsdS_B*(rB- mB-) *gal dcm* (DE3) pLysSRARE2 (Cam^r)

E. coli Rosetta (DE3) Zellen zeichnen sich durch die Expression von sechs zusätzlichen tRNAs mit seltenen Codons aus, die die Expression von Proteinen ermöglichen, die diese Codons vermehrt beinhalten. Diese Zellen wurden für die Herstellung der C-Domäne von VP30 verwendet (VP30_{CTD}) (nach [107]) und besitzen eine Chloramphenicol-Resistenz.

2.4.2 Bakterielle Zellkultur mit Flüssigmedium

Das Kultivieren der verschiedenen Bakterienstämme erfolgte in LB-Medium (*Lysogeny Broth*; 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L Pepton, 10 g/L NaCl, 0.4 mL NaOH (10 M; nach [108]) unter Schütteln (180-220 rpm) im Schüttelinkubator (GFL 3033) bei 37 °C. Je nach Anwendung wurden 3 mL LB-Medium (als Übernachtskulturen für Plasmidpräparationen (s. 2.6.1) und Vorkulturen zur Proteinexpression (s. 2.8.1)) oder 300 mL LB-Medium (Plasmidpräparation im großen Maßstab (s. 2.6.1) und Proteinexpressionen (s. 2.8.1)) verwendet und entsprechend mit Ampicillin (Amp; Endkonzentration: 100 μ g/mL) und/oder Chloramphenicol (Cam; Endkonzentration: 34 μ g/mL) versetzt.

Um eine bakterielle Zellsuspension langfristig zu lagern, wurden Glycerin-Kulturen angelegt. Hierfür wurden 0.5 mL Bakteriensuspension mit 0.5 mL Glycerin (99.5%; steril) versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.4.3 Bakterielle Zellkultur mit Festmedium

Um flüssiges Nährmedium zu Nährböden zu verfestigen, wurden so genannte LB-Agar-Platten hergestellt. Hierfür wurde Agar (15 g/L) zum LB-Medium zugegeben und autoklaviert (121 °C, 2.0 bar, 15 min). Nachdem die Lösung auf ca. 55 °C abgekühlt war, wurde ggf. Antibiotikum (i.d.R. Amp und/oder Cam 1:1 000) als Selektionsmarker zugesetzt, die Lösung in Petrischalen (*Sarstedt*) gegossen und aushärten gelassen.

Auf die ausgehärteten LB-Agar-Platten konnten nun Bakteriensuspensionen (z.B. nach einer Transformation s. Kap. 2.4.6) ausgestrichen werden. Die Inkubation der beimpften Agar-Platten erfolgte stets über Nacht bei 37 °C in einem Inkubator (*Memmert*). Die Platten konnten anschließend bei 4 °C gelagert werden. Zum Inokulieren von Flüssigkulturen wurden Einzelkolonien von den Agar-Platten ausgewählt.

2.4.4 Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm

Um das bakterielle Wachstum zu verfolgen, erfolgten Messungen der optischen Dichte der Zellsuspensionen bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) am Photometer (7305 Spectrophotometer; *Jenway*). Hierfür wurde zunächst eine Hintergrundmessung mit frischem LB-Medium (1 mL) in transparenten Einmal-Küvetten (*Sarstedt*) durchgeführt und anschließend in regelmäßigen Abständen die Zelldichte gemessen (jeweils 1 mL). Im Rahmen dieser Arbeit war dies bei der rekombinanten Proteinherstellung von Bedeutung, da hier die Induktion der Proteinexpression in den Expressionskulturen i.d.R. bei einer OD_{600} von 0.6-0.8 erfolgte, was der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen entspricht.

2.4.5 Präparation chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen

Die Präparation chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte aus einer 3 mL Übernachtskultur. Mit dieser wurden 150 mL LB-Medium inokuliert und bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von 0.6 unter Schütteln wachsen gelassen. Die Zellen wurden pelletiert (5 000 rpm, 7 min, 4 °C) und anschließend in 15 mL gekühlter TFB-1 Lösung (10 mM MOPS pH 7.0, 10 mM RbCl) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert (siehe oben) und das Zellpellet zuletzt in 6 mL vorgekühlter TFB-3 Lösung (100 mM MOPS pH 6.5, 50 mM $CaCl_2$, 10 mM KCl, 15% Glycerin (v/v)) resuspendiert. Nach dem Aliquotieren in je 50 µL wurden die nun chemisch-kompetenten *E. coli* Zellen in Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden chemisch-kompetente *E. coli* DH5 α (DE3), *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* BL21 (DE3) pLysS und *E. coli* Rosetta (DE3) Zellen verwendet (s. Kap. 2.4.1).

2.4.6 Transformation bakterieller Zellen

Um Plasmide in die verschiedenen chemisch-kompetenten Zellen einzubringen, wurde eine Transformation mittels Hitzeschock durchgeführt. Dafür wurde das Plasmid (Retransformation: 100 ng Plasmid; Ligation: 10 μ L Ligationsansatz; s. Kap. 2.6.6) mit 50 μ L chemisch-kompetenten Zellen vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 45 sec und eine kurze Inkubation (ca. 2 min) auf Eis. Zur Zellsuspension wurden nun 450 μ L LB-Medium hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Bei Plasmiden aus einem Ligationsansatz wurde anschließend zentrifugiert (2 500 rpm, 5 min), das Pellet in 50 μ L LB-Medium resuspendiert und auf einer LB-Agar-Platte (mit entsprechendem Selektionsmarker) ausgestrichen. Bei einer Retransformation wurden aus den 500 μ L Zellsuspension 50 μ L entnommen und auf einer LB-Agar-Platte (mit entsprechendem Selektionsmarker) ausgestrichen. Die Agar-Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.5 Generelle Nukleinsäuretechniken

In den folgenden Kapiteln werden Techniken beschrieben, die sowohl zur Behandlung von DNA als auch von RNA verwendet wurden.

2.5.1 Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren

Zur Aufreinigung von Nukleinsäuren wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Hierfür wurde der Probe ein Volumen Phenol (Phenol im Fall von DNA, saures Phenol im Fall von RNA) zugefügt, gründlich mit einem Vortexmischer gemischt und für 10 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase (enthält die Nukleinsäuren) wurde abgenommen und unter Vermeidung der Verschleppung der Interphase (enthält Proteine und DNA im Fall von saurem Phenol) in ein neues Reagiergefäß überführt. Anschließend wurde ein Volumen Chloroform hinzugegeben, erneut gemischt, zentrifugiert und die wässrige von der organischen Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde wieder in ein neues Reagiergefäß gegeben und mit einem Volumen Isopropanol versetzt und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH ~4.9) angesäuert. Nach kurzem Durchmischen erfolgte eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die ausgefallenen Nukleinsäuren pelletiert (13 000 rpm, 30 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Als letzter Schritt wurde das Pellet mit 70-75% Ethanol gewaschen und bei

Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet wurde (abhängig von der Größe) in 50-200 µL ddH₂O resuspendiert.

2.5.2 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäure-Lösungen

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäure-Lösungen erfolgte über die Messung der Absorption der Nukleinsäurebasen bei einer Wellenlänge von 260 nm am Photometer (*Biomate 3*). Hierfür wurde zunächst der Hintergrund unter Verwendung von 100 µL ddH₂O in einer Halbmikro-Quarzküvette (*Hellma*) vermessen. Die zu bestimmende Probe wurde i.d.R. 1:100 mit ddH₂O verdünnt und ebenfalls vermessen, wobei der Berechnung der Konzentration das Lambert-Beer'sche Gesetz zugrunde liegt.

Die Reinheit einer Nukleinsäure-Lösung kann über das Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm bestimmt werden, da Verunreinigungen (z.B. Proteine) ein Absorptionsmaximum bei 280 nm besitzen (z.B. aromatische Aminosäuren). Bei einer nicht-kontaminierten Nukleinsäure-Lösung wird ein Verhältnis von 1.8-2.0 erwartet.

2.5.3 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode, um Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld aufzutrennen. Da Nukleinsäuren ein Phosphat-Rückgrat und damit negative Eigenladungen besitzen, wandern sie in einer Gelmatrix durch Anlegen eines elektrischen Feldes zur Anode. Die Auftrennung der Nukleinsäuren kann hierbei direkt mit ihrer Größe korreliert werden.

Bei einer Gelelektrophorese von DNA-Proben wurde stets ein Größenstandard (2-Log DNA ladder (0.1-10.0 kb; *New England Biolabs*), 100 bp DNA ladder (100-1 500 bp; *New England Biolabs*) oder 10 bp DNA ladder (10-330 bp; *InvitrogenTM*) aufgetragen, um die Größe der aufgetragenen Fragmente vergleichen zu können. Bei der Analyse von RNA-Proben wurde eine Referenz-RNA bekannter Größe aufgetragen.

Tab. 11 Zusammensetzung der nativen und denaturierenden 2-fach Puffer für RNA-Proben (PP = Probenpuffer).

Komponente	2 x denaturierender PP	2 x nativer PP
10 x TBE-Puffer	2 x TBE-Puffer	2 x TBE-Puffer
Formamid	66% (v/v)	-
Urea	2.6 M	-
Glycerin	-	30% (v/v)
Bromphenolblau	0.02% (w/v)	0.02% (w/v)
Xylencyanolblau	0.02% (w/v)	0.02% (w/v)

*10 x TBE-Puffer: 890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA

Die zu analysierenden DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 5 x DNA-Probenpuffer versetzt (100 mM Tris/HCl pH 7.5, 50 mM EDTA, 70% Glycerin (v/v), 0.05% Bromphenolblau (w/v) und 0.05% Xylencyanolblau (w/v)). Bei RNA-Proben wurde je nach Bedarf nativer oder denaturierender Probenpuffer verwendet. Die Zusammensetzung der beiden Puffer wird in Tab. 11 zusammengefasst.

In dieser Arbeit wurden in den verschiedenen Anwendungsbereichen zwei unterschiedliche Gelmatrizes (Polyacrylamid und Agarose) verwendet, die im Folgenden beschrieben werden.

2.5.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde hauptsächlich zur Auftrennung von DNA-Proben verwendet, bei denen Fragmente > 300 bp erwartet wurden, wobei kleine Fragmente aufgrund der Porenbildung in der Matrix eine höhere Mobilität aufweisen als große DNA-Fragmente. Hierfür wurde 1 x TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA) mit 1% Agarose (w/v) versetzt und erhitzt. Nachdem die Agarose vollständig gelöst war, wurde Ethidiumbromid (EtBr; Endkonzentration: 500 ng/mL) hinzugegeben, die Lösung in eine Form gegossen, ein Kamm zur Aussparung der Probenaschen eingesetzt und die Lösung bei Raumtemperatur durch Abkühlen aushärten gelassen. Anschließend wurde das Gel in der Elektrophoresekammer mit 1 x TBE-Puffer überschichtet. Nach dem Auftragen der Proben und der Größenreferenz wurde für ca. 1 h eine Stromstärke von 80 mA angelegt. Die DNA-Fragmente konnten abschließend unter UV-Licht aufgrund der Interkalation von Ethidiumbromid visualisiert werden (siehe auch Kap. 2.5.5).

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde sowohl im analytischen (zur Auswertung einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR; s. Kap. 2.6.4) oder zur Kontrolle eines Restriktions-verdaus (s. Kap. 2.6.7) als auch im präparativen Maßstab (zur Aufreinigung von PCR-Fragmenten für eine Klonierung) durchgeführt.

2.5.3.2 Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese

Aufgrund ihrer feineren Poren eignet sich eine Gelmatrix auf Polyacrylamid (PAA)-Basis besonders für Nukleinsäuren mit einer Größe von < 300 Nukleotiden. Die Polymerisation von PAA-Gelen beruht auf der Vernetzung von Acrylamid und Bisacrylamid durch den Radikalstarter Ammoniumperoxodisulfat (APS; 10% (w/v); eingesetzt: 1/100) und den Katalysator Tetramethylethyldiamin (TEMED; eingesetzt: 1/1000). Die dadurch entstehende netzartige Gelmatrix erlaubt es kleinen Nukleinsäurefragmenten schneller durch sie hindurchzuwandern als größeren Nukleinsäurefragmenten. Je nach relevantem Auftrennungsbereich kann durch Variation des eingesetzten Acrylamidgehaltes und des Verhältnisses von Acrylamid zu Bisacrylamid die Vernetzung der Gelmatrix so verändert

werden, dass eine optimale Auftrennung der Nukleinsäuren erzielt werden kann (dies wird bei den entsprechenden Abbildungen explizit angegeben).

Die Gelelektrophorese auf Polyacrylamid-Basis wurde entweder unter nativen oder denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Die Zusammensetzung der dafür verwendeten Stamm-Lösungen sind in folgender Tabelle zusammengefasst (s. Tab. 12).

Tab. 12 Übersicht über die verwendeten Stock-Lösungen für eine PAA-Gelelektrophorese.

Komponente	20% PAA-Lösung nativ	20% PAA-Lösung denaturierend	8 M Urea
Acrylamid/M-Bis (24:1; 50%)	400 mL	400 mL	-
5x TBE-Puffer*	200 mL	200 mL	200 mL
Urea	-	480 g	480 g
ddH ₂ O	ad 1000 mL	ad 1000 mL	ad 1000 mL

*5 x TBE-Puffer: 445 mM Tris, 445 mM Borsäure, 10 mM EDTA

Während bei denaturierenden PAA-Gelen die adäquate Prozentigkeit durch Mischen der 20%igen PAA-Stammlösung mit der Urea-Lösung (8 M) eingestellt werden konnte, wurde bei nativen PAA-Gelen stets eine Lösung mit der gewählten PAA-Prozentigkeit angesetzt, hier am Beispiel der 20%igen Lösung gezeigt (s. Tab. 12).

Um Nukleinsäuren ihrer Länge nach aufzutrennen ohne mögliche Sekundärstrukturen zu berücksichtigen (z.B. nach einer *in vitro* T7-Transkription oder zur Analyse nach einer experimentellen Sekundärstrukturbestimmung), wurden denaturierende PAA-Gele verwendet. Native PAA-Gele wurden für Proben mit doppelsträngigen (ds) Nukleinsäuren verwendet bzw. um Komplexe (DNA:RNA- bzw. RNA:RNA-Hybride oder RNA:Protein-Komplexe) zu detektieren, die unter denaturierenden Bedingungen instabil wären.

Die Visualisierung der Nukleinsäuren erfolgte entweder über Ethidiumbromid- bzw. SYBR® Gold-Färbung, UV-*shadowing* oder Autoradiographie (s. Kap. 2.5.5).

Zur Untersuchung der RNA:VP30 Komplexe wurden modifizierte Gel- und Laufpuffer verwendet, die explizit in Kapitel 2.10.2.2 beschrieben werden.

2.5.4 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

Eine radioaktive Markierung von Nukleinsäuren ermöglicht es diese bereits in kleinsten Mengen zu detektieren. In dieser Arbeit wurden DNA- und RNA-Oligonukleotide für Bindungsstudien mit VP30 und zur Sekundärstrukturanalyse radioaktiv markiert.

In der Regel wurden die Oligonukleotide am 5'-Ende unter Verwendung einer T4 Polynukleotidkinase (PNK; *Fermentas*, *Thermo Scientific*) mit ³²P (in Form eines Phosphat-Restes) radioaktiv markiert. Hierzu ist es notwendig, dass die Oligonukleotide eine 5'-OH-Gruppe tragen, was entweder über die Verwendung von Guanosin als Startnukleotid in einer

in vitro T7-Transkription oder über eine Dephosphorylierung des *in vitro* Transkripts erreicht werden kann.

Synthetisch hergestellte Oligonukleotide haben bei Lieferung i.d.R. ein 5'-OH-Ende und können demnach direkt für eine radioaktive Markierung verwendet werden.

In folgender Tabelle ist der Reaktionsansatz für die radioaktive Markierung am 5'-Ende dargestellt (s. Tab. 13).

Tab. 13 Ansatz für eine 5'-Markierung von Oligonukleotiden.

Komponente	Menge
Oligonukleotid	30 pmol
10 x PNK-Puffer A	1.5 µL
[γ- ³² P]-ATP	2.5 µL
PNK	1.0 µL
ddH ₂ O	ad 15.0 µL

Der Reaktionsansatz wurde für 1-1.5 h bei 37 °C inkubiert.

Eine weitere Möglichkeit der radioaktiven Markierung besteht darin Oligonukleotide am 3'-Ende mit Hilfe einer T4 RNA Ligase (*Fermentas, Thermo Scientific*) und 5'-³²P-Cytidin-3',5'-biphosphat ([5'-³²P]-pCp) zu markieren. Dabei ist es im Fall eines 2'-3'-Cyclophosphates am 3'-Ende der RNA notwendig, dieses zu hydrolysieren, um ein 3'-OH-Ende zu erzeugen (s. Kap. 2.7.3). Ein zyklisches Phosphat am 3'-Ende entsteht z.B. wenn in der T7-Transkription ein *hammerhead*-Ribozym für die Homogenität der 3'-Enden einer RNA kotranskribiert und autokatalytisch abgespalten wurde. Für die Markierung am 3'-Ende wurden die folgenden Komponenten zusammengegeben (s. Tab. 14).

Tab. 14 Ansatz einer Markierung des 3'-Endes von Oligonukleotiden.

Komponente	Menge
Oligonukleotid	30 pmol
10 x T4 RNA Ligase Puffer	1.5 µL
ATP (2 mM)	2.25 µL
[5'- ³² P]-pCp	2.5 µL
T4 RNA Ligase	2.0 µL
ddH ₂ O	ad 15.0 µL

Die Inkubation des Reaktionsansatzes einer 3'-Markierung erfolgte unter Schütteln bei 4 °C über Nacht.

Anschließend folgte die Aufreinigung der markierten Nukleinsäuren (analog für 5'- und 3'-Markierungen) über ein denaturierendes PAA-Gel, aus dem die relevanten Banden nach

autoradiographischer Detektion (Exposition: 1 min; s. Kap. 2.5.5.4) mit einem Skalpell ausgeschnitten wurden. Die Gelstücke wurde zur Elution über Nacht in 1 M Natriumacetat-Lösung (pH ~4.9) bei 4 °C geschüttelt. Der Überstand wurde von den Gelstücken abgenommen und zwei Volumen Isopropanol zugegeben, kurz geschüttelt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die gefällten Nukleinsäuren wurden pelletiert (13 000 rpm, 30 min, 4 °C), das Pellet mit Ethanol (70% (v/v)) gewaschen und nach Entfernen des Überstandes bei Raumtemperatur für ca. 5 min getrocknet. Je nach Intensität der gemessenen Radioaktivität wurde das Pellet in 5-20 µL ddH₂O aufgenommen. Der Erfolg der Markierung wurde mit Hilfe eines Szintillationszählers (Tri-Carb 2810TR) überprüft.

Eine alternative Aufreinigung der markierten Nukleinsäuren wurde mit Hilfe von Größenausschlusschromatographie-Säulen (illustra MicroSpin G-25 columns, *GE Healthcare*) durchgeführt. Das Prinzip hierbei beruht darauf, dass das unverbrauchte [γ -³²P]-ATP (bzw. [5'-³²P]-pCp) aufgrund seiner längeren Retentionszeit in der Säulenmatrix verbleibt, während die markierte RNA im Eluat vorliegt. Diese Art der Aufreinigung ist nur für Oligonukleotide > 10 nt geeignet.

Hierfür musste der Reaktionsansatz mit ddH₂O auf mindestens 25 µL erhöht werden. Nach Resuspension des Säulenmaterials wurde für 1 min bei 2 800 rpm zentrifugiert. Der Reaktionsansatz wurde auf die präparierte Säulenmatrix gegeben und für 2 min bei 2 800 rpm zentrifugiert. Das Eluat (das die markierte RNA enthält) wurde abschließend am Szintillationszähler auf die radioaktive Markierung hin überprüft.

2.5.5 Visualisieren von Nukleinsäuren

Um das Ergebnis einer Gelelektrophorese beurteilen zu können ist einer der entscheidenden Schritte die Visualisierung von Nukleinsäuren. Hierfür wurden je nach Art des Experiments verschiedene Techniken angewandt.

2.5.5.1 Ethidiumbromid-Färbung

Die Visualisierung von Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid (EtBr) beruht auf der Fähigkeit dieses Farbstoffes in Nukleinsäuren zu interkalieren. Unter UV-Belichtung emittiert das interkalierte EtBr Licht mit einer Wellenlänge von 590 nm und ist somit sichtbar (orange).

Bei Agarose-Gelen wurde das EtBr bereits in die Gel-Lösung hineingegeben (Endkonzentration: 500 ng/mL), so dass keine nachträgliche Färbung notwendig war, sondern das Gel nach Beendigung der Elektrophorese direkt mit UV-Licht bestrahlt und dokumentiert werden konnte.

Um Nukleinsäuren in PAA-Gelen mit EtBr sichtbar zu machen, wurde das PAA-Gel in eine Folie überführt, die an drei Seiten gut verschlossen wurde. In diese Folie wurde EtBr-Lösung

hinzugegeben und das Gel für ca. 10 min geschwenkt. Die EtBr-Lösung wurde anschließend entfernt und die angefärbten Nukleinsäuren unter UV-Licht dokumentiert.

2.5.5.2 SYBR® Gold-Färbung

Ein alternativer Farbstoff für die Detektion von Nukleinsäuren ist SYBR® Gold (*Invitrogen™ Life Technologies*), der als 10 000-fach Konzentrat kommerziell erhältlich ist. Er wurde mit 5 x TBE-Puffer zu einer gebrauchsfertigen Lösung verdünnt, wobei pro Gel 50 mL Färbelösung angesetzt wurden. Das Gel wurde ca. 1 h unter Lichtausschluss in dieser Lösung geschwenkt und abschließend unter UV-Belichtung dokumentiert.

Diese Färbemethode wurde vor allem für kurze, pyrimidin-reiche RNAs (s. Tab. 10) verwendet.

2.5.5.3 UV-shadowing

Bei der Präparation einer *in vitro* transkribierten RNA, die i.d.R. über ein denaturierendes PAA-Gel aufgereinigt wurde (s. Kap. 2.7.1), sollte vermieden werden diese mit einem Farbstoff anzufärben. Aus diesem Grund wurde das so genannte UV-shadowing angewandt. Hierbei wird die Tatsache ausgenutzt, dass Nukleinsäuren im UV-Bereich absorbieren und somit auch ohne Verwendung eines Farbstoffes sichtbar gemacht werden können.

Das Gel mit dem *in vitro* T7-Transkriptionsansatz wurde hierbei nach Beendigung der Elektrophorese in Folie eingeschlagen. Das eingeschlagene Gel wurde auf eine Dünnschichtchromatographie-Platte, die mit einem UV-Indikator versehen war, gelegt und mit UV-Licht bestrahlt. An der Stelle an der der Fluoreszenzindikator nicht sichtbar ist, wurde das Anregungslicht von der RNA im Gel absorbiert. Somit konnte die RNA sichtbar gemacht und die relevante Bande mit einem Stift markiert werden. Die weitere Vorgehensweise wird im Kapitel 2.7.1 beschrieben.

2.5.5.4 Autoradiographie

Wie in Kap. 2.5.4 beschrieben, ist die Markierung von Nukleinsäuren mit einem radioaktiven Isotop (hier: ^{32}P) eine sehr sensitive Methode, um bereits kleinste Mengen von Nukleinsäuren nachweisen zu können. Die Detektion erfolgte hierbei mittels Autoradiographie. Das Gel wurde nach Durchführung der Elektrophorese in Folie eingeschlagen und in einer lichtundurchlässigen Kassette mit einer Bildplatte (engl.: *imaging plate*) für 1 min – 16 h (abhängig von Experiment und Menge des eingesetzten radioaktiven Materials) bedeckt. Anschließend wurde die Bildplatte in einem Scanner (Fujifilm FLA-3000) eingelesen und mit der Software AIDA (version 3.45) analysiert bzw. die Intensität der radioaktiven Signale quantifiziert.

2.6 DNA-Techniken

2.6.1 Plasmidpräparation

Die Präparation von Plasmiden aus bakteriellen Zellen erfolgte in zwei verschiedenen Maßstäben. Wurden Plasmide aus einer 3 mL Übernachtskultur (ÜNK) präpariert, wurde das GeneJet Plasmid Miniprep Kit (*Fermentas, Thermo Scientific*) nach Angaben des Herstellers verwendet, wobei die Elution in nur 30 µL (anstatt 50 µL) erfolgte. Für die Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wurde eine 250 mL Bakterienkultur verwendet, aus der die Plasmid-DNA unter Verwendung des Plasmid DNA Purification Kits (NucleoBond® AX 500, *Macherey-Nagel*) nach Angaben des Herstellers gewonnen wurde. Hierbei wurde das Pellet in 100-200 µL ddH₂O gelöst. Nach der Präparation erfolgte stets eine Konzentrationsmessung wie in Kap. 2.5.2 beschrieben.

2.6.2 Phosphorylierung von 5'-OH-Gruppen

Für die Herstellung der verschiedenen Plasmidvarianten wurden zunächst die verwendeten *Primer* an ihrem 5'-Ende phosphoryliert (s. Tab. 15).

Tab. 15 Ansatz für die Phosphorylierung von 5'-OH-Gruppen von *Primern*.

Komponente	Menge
<i>Primer</i>	50 pmol
10 x PNK Puffer A	2.0 µL
ATP (10 mM)	2.0 µL
T4 PNK (10 U/µL)	1.0 µL
ddH ₂ O	ad 20.0 µL

Die Inkubation erfolgte für 20 min bei 37 °C mit anschließender Hitzeinaktivierung bei 75 °C für 10 min.

2.6.3 Dephosphorylierung von DNA

Sollte ein linearisiertes Plasmid mit einem spezifischen *Insert* ligiert werden, wurde die Plasmid-DNA zunächst unter Verwendung der *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP; *New England Biolabs*) dephosphoryliert. Dies dient dazu, eine Selbstligation des Plasmids (ohne eingesetztes *Insert*) zu vermeiden. Der Ansatz ist in folgender Tabelle angegeben (s. Tab. 16).

Tab. 16 Ansatz zur Dephosphorylierung eines linearisierten Plasmids.

Komponente	Volumen / μ L
Plasmid (0.1 μ g/ μ L)	20.0
10 x FastDigest Puffer	2.0
SAP (1 U/ μ L)	2.0
ddH ₂ O	ad 30.0

Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37 °C mit anschließender Hitzeinaktivierung für 15 min bei 65 °C.

2.6.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR; engl.: *Polymerase Chain Reaction*) ist eine Standardmethode, um DNA exponentiell zu amplifizieren. Der Ablauf einer PCR setzt sich aus drei Schritten zusammen: Denaturierung, Anlagerung und Elongation. Bei der Denaturierung werden die DNA-Doppelstränge aufgeschmolzen, im Schritt der Anlagerung können die *Primer* an das Templat hybridisieren, um dann im 3. Schritt templatabhängig verlängert zu werden (Elongation). Diese drei Schritte werden mehrfach (hier: 30 x) wiederholt. Ein typisches PCR-Temperatur-/Zeitprogramm setzte sich folgendermaßen zusammen (s. Tab. 17).

Tab. 17 Übersicht über das Temperaturprogramm einer PCR (Pol = Polymerase; T_M = Schmelztemperatur).

Schritt	Temperatur / °C	Zeit
Initialdenaturierung	95	3 min
Denaturierung	95	35 sec
Anlagerung	T _M – (3-4 °C)	35 sec
Elongation	72 °C	Pfu Pol: 2 min / kb Phusion Pol: 30 sec / kb
finale Elongation	72 °C	7 min

30 x

Die Temperatur der Anlagerung wurde ca. 3-4 °C unterhalb des Schmelzpunktes (T_M) der verwendeten *Primer* gewählt (berechnet mit Hilfe des *OligoAnalyzers* von *Integrated DNA Technologies*; s. Kap. 2.11.6). Bei der Elongation ist die Länge des PCR-Produktes zu beachten, da hiernach unter Berücksichtigung der Geschwindigkeit der verwendeten Polymerase (Pol) die Elongationszeit berechnet wird. Der Ansatz für eine PCR-Reaktion setzte sich folgendermaßen zusammen (s. Tab. 18 und Tab. 19).

Tab. 18 PCR-Ansatz unter Verwendung der Pfu Polymerase (*Fermentas, Thermo Scientific*).

Komponente	Menge
10 x Pfu Puffer (+ MgSO ₄)	2.5 µL
dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	0.5 µL
<i>Primer (forward)</i>	5 pmol
<i>Primer (reverse)</i>	5 pmol
Templat (70-100 ng/µL)	1.0 µL
Pfu Polymerase (2.5 U/µL)	0.5 µL
ddH ₂ O	ad 25.0 µL

Tab. 19 PCR-Ansatz unter Verwendung der Phusion Polymerase (*Finnzymes*).

Komponente	Menge
5 x Phusion HF Puffer	5.0 µL
dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	0.5 µL
<i>Primer (forward)</i>	5 pmol
<i>Primer (reverse)</i>	5 pmol
Templat (70-100 ng/µL)	1.0 µL
Phusion Polymerase (2 U/µL)	0.5 µL
ddH ₂ O	ad 25.0 µL

Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden stets mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft und dokumentiert (s. Kap. 2.5.3.1)

Im Fall einer Aufreinigung von PCR-Fragmenten (z.B. bei einer Plasmidkonstruktion) über ein präparatives Agarosegel (s. Kap. 2.5.3.1) wurden die erhaltenen PCR-Fragmente mit EtBr unter UV-Licht sichtbar gemacht (s. Kap. 2.5.5.1), ausgeschnitten und anschließend mit dem Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System-Kit (*Promega*) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Elution fand in 30 µL ddH₂O statt. Daran schlossen sich i.d.R. direkt eine Ligation (s. Kap. 2.6.6) und Transformation (s. Kap. 2.4.6) an.

2.6.5 *DpnI*-Verdau

Um nach einer PCR die Matrizen-DNA abzubauen, wurde ein *DpnI*-Verdau durchgeführt. *DpnI* ist eine Restriktionsendonuklease, die spezifisch methylierte DNA degradiert, indem sie das Motiv GATC erkennt, wenn Adenin an Position N6 methyliert ist. Dies trifft im Fall einer vorher durchgeführten PCR nur auf die Templat-DNA zu, nicht aber auf die PCR-Produkte. Für den Verdau wurde der folgende Ansatz zusammengegeben (s. Tab. 20).

Tab. 20 Ansatz eines *DpnI*-Verdau nach Durchführung einer PCR.

Komponente	Volumen / μ L
PCR-Ansatz	22.0
10 x Tango Puffer	3.0
<i>DpnI</i> (10 U/ μ L)	3.0
ddH ₂ O	ad 30.0

Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 80 °C für 5 min inaktiviert.

2.6.6 Ligation

Die Ligation wurde entweder über so genannte *blunt-ends* (dt.: glatte Enden; verwendet bei phosphorylierten PCR-Produkten) oder *sticky-ends* (dt.: klebrige Enden; bei Ligation eines geöffneten Plasmids mit einem Insert) durchgeführt. In beiden Fällen wurden die Ausgangsmaterialien vor der Ligation über ein präparatives Agarosegel mit anschließender Gelelution aufgereinigt (s. Kap. 2.5.3.1). Für die Ligationsstrategien über *sticky-* bzw. *blunt-ends* wurden verschiedene Ansätze gewählt. In der folgenden Tabelle (s. Tab. 21) sind die beiden Ligationsvarianten zusammengefasst. Ligation I beschreibt die Variante der Ligation von Plasmid und Insert über *sticky-ends*. Ligation II wurde verwendet, wenn ein PCR-Produkt über *blunt-ends* ligiert wurde.

In beiden Fällen wurde der Ligationsansatz für mind. 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Tab. 21 Ansätze zweier Ligationsvarianten. Ligation I beschreibt den Ansatz einer Ligation von linearisiertem Plasmid mit einem Insert, während in Ligation II ein PCR-Produkt ligiert wurde.

Komponente	Ligation I / μ L	Ligation II / μ L
linearisiertes Plasmid	1.0	-
Insert	5.0	-
PCR-Produkt	-	8.0
10 x T4 Ligase Puffer	1.0	1.0
Ligase (5 U/ μ L)	1.0	1.0
ddH ₂ O	ad 10.0	-

Anschließend erfolgte mit dem Ligationsprodukt eine Transformation chemisch-kompetenter *E. coli* DH5 α Zellen (s. Kap. 2.4.6).

2.6.7 Restriktionsverdau

Ein Restriktionsenzym der Klasse II ist in der Lage spezifische, meist palindromische Sequenzen einer doppelsträngigen DNA zu erkennen und innerhalb dieser endonukleolytisch zu spalten. In dieser Arbeit wurde von solchen Enzymen Gebrauch gemacht,

um (i) den Erfolg einer Klonierung mit Hilfe eines analytischen Restriktionsverdaus zu überprüfen und (ii) das Templat einer *in vitro* T7-Transkription im präparativen Maßstab zu linearisieren.

In folgender Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme gelistet (s. Tab. 22).

Tab. 22 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme mit ihrer Erkennungssequenz.

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz
<i>Bam</i> HI	GGATCC
<i>Eco</i> RI	GAATTC
<i>Nhe</i> I	GCTAGC

*Dpn*I gehört ebenfalls zur Klasse der Restriktionsenzyme und wurde bereits im Kapitel 2.6.5 ausführlich beschrieben.

Die Ansätze der analytischen bzw. präparativen Restriktionsverdau werden im Folgenden genau beschrieben. In beiden Fällen wurde der Ansatz für 25 min bei 37 °C inkubiert und anschließend für 5 min bei 80 °C inaktiviert. Das Ergebnis bzw. der Erfolg des Verdaus wurde stets mit Hilfe einer Agarose- bzw. PAA-Gelelektrophorese überprüft (s. Kap. 2.5.3). Vor allem im Fall des präparativen Verdaus für eine folgende *in vitro* T7-Transkription ist es essentiell, dass das Plasmid vollständig linearisiert wurde. Dies wurde mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese überprüft, bei der 0.5 µL des präparativen Verdaus aufgetragen wurden (s. Kap. 2.5.3.1).

Tab. 23 Ansätze eines analytischen und präparativen Restriktionsverdaus.

Komponente	analytischer Restriktionsverdau	präparativer Restriktionsverdau
Plasmid	~300 ng	~90 µg
10 x FastDigest Puffer	1.0 µL	10.0 µL
Enzym I (z.B. <i>Eco</i> RI)	1.0 µL	20.0 µL
Enzym II (z.B. <i>Bam</i> HI)	1.0 µL	-
ddH ₂ O	ad 10.0 µL	ad 100.0 µL

Im Fall einer unvollständigen Linearisierung, wurde die Reaktion erneut durchgeführt. An die Linearisierung eines Plasmids für eine *in vitro* T7-Transkription schloss sich stets eine Phenol/Chloroform-Extraktion zur Aufreinigung des Plasmids an (s. Kap. 2.5.1).

2.6.8 Sequenzierung

Die Plasmid-Sequenz wurde stets mit einer Sequenzierung überprüft, die bei *eurofins genomics* (MWG) nach Firmenangaben durchgeführt wurde. Dazu wurden 15.0 µL einer Plasmidlösung (50-100 ng/µL) verschickt und entweder mit Standard-*Primern* von *eurofins genomics* oder mit benutzerdefinierten *Primern* sequenziert. Genaue Angaben zu den verwendeten Sequenzierungs-*Primern* finden sich in Kapitel 2.3.1.2.

2.7 RNA-Techniken

2.7.1 *In vitro* T7-Transkription

Um die verschiedenen RNA-Substrate herzustellen wurde eine *run-off in vitro* T7-Transkription auf Basis eines linearisierten Plasmids (s. Kap. 2.6.7) durchgeführt. Für jede RNA wurde zunächst eine *in vitro* Test-T7-Transkription (50 µL Maßstab) mit variierenden MgCl₂-Konzentrationen (20-60 mM Endkonzentration) angesetzt, wobei sich dabei für alle hier hergestellten RNAs eine MgCl₂-Endkonzentration von 40 mM als optimal herausstellte.

Die Ansätze werden in folgender Tabelle zusammengefasst (s. Tab. 24), wobei alle Substanzen (außer die T7 RNA-Polymerase (RNAP)) vor ihrer Verwendung gründlich gemischt wurden.

Tab. 24 Ansätze für *in vitro* T7-Transkriptionen im 50 µL- und 200 µL Maßstab;
die Angabe x + x µL der T7 RNA Polymerase bezeichnet die wiederholte Zugabe von x µL nach 2 h.

Komponente	50 µL-Ansatz	200 µL-Ansatz
HEPES (1 M)	4 µL	16 µL
MgCl ₂ (400 mM)	5 µL	20 µL
DTT (100 mM)	2.5 µL	10 µL
Spermidin (100 mM)	0.5 µL	2 µL
Plasmid (1-2 µg/µL)	2.5 µL	10 µL
NTPs (jeweils 100 mM)	2 µL	8 µL
Guanosin* (30 mM; optional)	15 µL	60 µL
T7 RNA Polymerase	1 + 1 µL	4 + 4 µL
ddH ₂ O	ad 50 µL	ad 200 µL

*auf 75 °C erwärmen

Um eine RNA in adäquater Menge herzustellen, wurden fünf 200 µL-Ansätze pipettiert und bei 37 °C für mindestens 4 h inkubiert, wobei nach 2 h Inkubation eine erneute Zugabe der T7 RNAP erfolgte.

Anschließend erfolgten eine Phenol/Chloroform-Extraktion (s. Kap. 2.5.1) und eine Aufreinigung über ein denaturierendes PAA-Gel (s. Kap. 2.5.3.2). Die RNA wurde via UV-*shadowing* sichtbar gemacht (s. Kap. 2.5.5.3), ausgeschnitten und über Nacht in 1 M

Natriumacetat (pH ~4.9; ca. 6 mL) unter Schütteln bei 4 °C eluiert. Die anschließende Fällung erfolgt mit 2 Volumina Isopropanol, wobei die RNA bei 8 000 rpm für 30 min bei 4 °C pelletiert wurde. Das Pellet wurde anschließend mit 70-75% (v/v) Ethanol gewaschen und in 50-100 µL ddH₂O aufgenommen.

Abschließend wurde die Konzentration der RNA photometrisch bestimmt (s. Kap. 2.5.2) und ihre Qualität auf einem denaturierenden PAA-Gel (Anfärbung i.d.R. mit EtBr) überprüft (s. Kap. 2.5.3.2 und 2.5.5.1). Die Lagerung der RNA erfolgte bei -20 °C.

2.7.2 Dephosphorylierung von RNA

Um RNAs an ihrem 5'-Ende phosphorylieren zu können (z.B. bei einer radioaktiven Markierung), ist es notwendig, dass diese mit einer 5'-OH-Gruppe vorliegen. Wurde bei einer *in vitro* T7-Transkription Guanosin als Startnukleotid verwendet (s. Kap. 2.7.1), ist dies bereits der Fall. Andernfalls liegen die Transkripte als 5'-Triphosphate vor und müssen dementsprechend mit einer Alkalischen Phosphatase (FAST-AP; *Fermentas*, *Thermo Scientific*) dephosphoryliert werden. Der Ansatz hierfür wird in folgender Tabelle aufgeführt (s. Tab. 25).

Tab. 25 Ansatz für die Dephosphorylierung von RNA.

Komponente	Menge
RNA	400 pmol
10 x FAST-AP Puffer	6.0 µL
FAST-AP (1 U/µL)	6.0 µL
ddH ₂ O	ad 60.0 µL

Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 37 °C. Anschließend wurden eine Phenol/Chloroform-Extraktion (s. Kap. 2.5.1) und eine erneute Konzentrationsmessung angeschlossen (s. Kap. 2.5.2).

2.7.3 Hydrolyse des 3'-terminalen 2',3'-Cyclophosphates

Bei RNA-Substraten, die an ihrem 3'-Ende ein *hammerhead*-Ribozym besitzen (hier: 154-1_HH und 2-158_HH), bildet sich ein 2',3'-Cyclophosphat nach der Abspaltung des kotranskribierten Ribozyms. Daher können solche RNAs ohne vorherige Hydrolyse dieses Cyclophosphates an ihrem 3'-Ende nicht radioaktiv markiert werden. Für die Hydrolyse wurde die T4 Polynukleotidkinase (PNK; *Fermentas*, *Thermo Scientific*) verwendet. Der Ansatz für eine solche Hydrolyse ist in folgender Tabelle dargestellt (s. Tab. 26).

Tab. 26 Ansatz der Hydrolyse des 2',3'-Cyclophosphates.

Komponente	Volumen / μ L
RNA (~ 2 μ g/ μ L)	19.0
5 x Puffer B*	5.0
T4 PNK (10 U/ μ L)	1.0

*5 x Puffer B: 250 mM MES pH 6.5, 500 mM MgCl₂

Es wurde für 4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgten eine Phenol/Chloroform-Extraktion (s. Kap. 2.5.1) und Konzentrationsmessung (s. Kap. 2.5.2).

2.7.4 Modifikation der RNA mit einer 5'-Cap(0)-Struktur

Die Modifikation von RNA mit einer Cap(0)-Struktur erfolgte mit dem *Vaccinia Capping System* (New England Biolabs) nach Herstellerangaben, die jedoch auf den Verwendungszweck und die hier verwendete RNA angepasst wurden.

Hierfür wurden 30 pmol eines *in vitro* Transkripts (mit 5'-Triphosphat) für 10 min bei 95 °C erhitzt und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Modifikation mit der Cap(0)-Struktur wurde in zwei Varianten angewandt: (i) in einer *Capping*-Reaktion wurden 30 pmol RNA eingesetzt und der Erfolg der Reaktion mittels denaturierender PAGE überprüft; (ii) zur radioaktiven Markierung wurde die Tatsache ausgenutzt, dass das α -Phosphat des GTP auf die RNA im Zuge der Modifikation übertragen wird; somit wurde durch Verwendung von α -³²P-GTP eine simultane *Capping*- sowie Markierungsreaktion durchgeführt. Die erfolgreiche Markierung zeigte somit gleichzeitig den erwünschten Einbau der Cap(0)-Modifikation (s. Tab. 27).

Tab. 27 Ansätze zur Modifikation einer RNA mit einer 5'-Cap(0)-Struktur.

Komponente	<i>Capping</i> -Reaktion	Radioaktive Markierung
RNA	30 pmol	30 pmol
10 x Capping Puffer	1.0 μ L	1.0 μ L
GTP (10 mM)	0.5 μ L	0.5 μ L
α - ³² P-GTP (3.3 μ M)	-	2.5 μ L
S-Adenosylmethionin (SAM)* (2mM)	0.5 μ L	0.5 μ L
Vaccinia Capping Enzyme	1.0 μ L	1.0 μ L

*SAM wurde frisch aus der 32 mM Stock-Lösung auf 2 mM verdünnt.

Die Inkubation erfolgte für 60 min bei 37 °C. Im Fall der radioaktiven Markierung wurde die RNA anschließend über eine denaturierende PAGE aufgereinigt und wie in Kap. 2.5.4 beschrieben behandelt.

2.7.5 Hybridisierung von DNA:RNA Komplexen

Es wurden verschiedene DNA-Sonden verwendet, die an RNA hybridisiert wurden (s. Kap. 2.3.1.3). Hierfür wurden zu 0.25 pmol RNA (radioaktiv markiert) 0.5 pmol DNA-Sonde hinzugegeben (Gesamtvolumen: 5.0 μL), wobei beide Komponenten in einem Tris/HCl-Puffer vorlagen (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 200 mM NaCl). Es folgte ein stufenweises Hybridisierungsprogramm (s. Tab. 28).

Tab. 28 Temperaturverlauf des Hybridisierungsprogrammes.

Temperatur /°C	95	90	80	70	60	50	40	30	20	10
Zeit /min	5	5	5	5	5	5	5	5	5	Pause

Der Erfolg der Hybridisierung wurde mittels eines nativen PAA-Gels überprüft (s. Kap. 2.5.3.2), bei dem die DNA:RNA Hybride ein verändertes Laufverhalten im Vergleich zur freien RNA aufwiesen.

2.7.6 Northern Blot

2.7.6.1 Herstellen der Digoxigenin-markierten Sonden

Für die Detektion von RNA mittels Northern Blot wurden zunächst Digoxigenin-haltige Sonden über eine *in vitro* T7-Transkription generiert. Hierfür wurden Plasmide, die die entsprechende *in vitro* T7-Transkriptionskassette enthielten (hier: pUC19_T7_80-1 und pUC19_T7_154-79) mittels *EcoRI* linearisiert (s. Kap. 2.6.7). Die notwendige Markierung der Sonden wurde hierbei über Digoxigenin-haltiges UTP (im *DIG RNA labeling mix* enthalten) eingeführt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll unter Verwendung des DIG RNA labeling mix (*Roche Diagnostics*; s. Tab. 29).

Tab. 29 Ansatz zur Herstellung von Digoxigenin-markierten Sonden.

Komponente	Volumen / μL
linearisiertes Plasmid	3.0
10 x transcription buffer	2.0
DIG RNA labeling mix	2.0
T7 Polymerase	2.0
ddH ₂ O	11.0

Der Ansatz wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert, mit 2.0 μL 10 mM EDTA-Lösung abgestoppt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.7.6.2 Transfer der RNA auf eine Nylonmembran

Um die RNA auf eine positiv geladene Membran (hier: Nylonmembran; *Roche*) zu transferieren, muss diese zunächst über ein Gel aufgetrennt werden. In dieser Arbeit wurden native PAA-Gele (5%-20%) verwendet, wobei die RNA-Proben vor der Elektrophorese mit denaturierendem Probenpuffer (s. Tab. 11) versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt wurden. Nach der Gelelektrophorese wurden das Gel, zwei *Whatman*-Filterpapiere sowie die Nylonmembran in 0.5 x TBE-Puffer geschwenkt und anschließend in die Blotting-Apparatur gelegt. Pro Gel wurde eine Stromstärke von 40 mA angelegt und über Nacht geblottet (ca. 14-16 h).

2.7.6.3 Vernetzen der RNA mit der Membran

Im Anschluss an das Blotten wurde die RNA direkt unter Verwendung von N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDC) mit der Membran vernetzt. Die EDC-Lösung wurde hergestellt, indem 245 µL 1-Methylimidazol auf 8 mL mit ddH₂O aufgefüllt wurden und der pH mit HCl auf 8.0 eingestellt wurde. Nach Zugabe von 0.75 g EDC wurde schließlich auf 24 mL mit ddH₂O aufgefüllt und ein *Whatman*-Filterpapier mit dieser Lösung getränkt. Die Membran wurde auf das Filterpapier platziert und für 2 h bei 60 °C inkubiert. Abschließend wurde die Membran mit ddH₂O gewaschen und bis zur weiteren Verwendung lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

2.7.6.4 Hybridisieren der Sonden mit der Membran und immunologische Detektion

Für die Hybridisierung der Sonden wurden 13 mL Hybridisierungslösung auf 68 °C vorgewärmt (Hybridisierungslösung: DIG Easy Hyb Granules, *Roche Diagnostics*; in 64 mL ddH₂O lösen). Die Membran wurde für 2 h bei 68 °C unter leichter Rotation vorhybridisiert. 5 µL der jeweiligen Sonde wurden für 5 min auf 95 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt und zu 13 mL Hybridisierungslösung gegeben. Die Membran wurde dann über Nacht bei 68 °C mit der Sonden-haltigen Hybridisierungslösung inkubiert.

Anschließend wurde die Membran mit Stringenz-Waschpuffern bei Raumtemperatur gewaschen (2 x 5 min in Stringenz-Waschpuffer 1 (2 x SSC-Lösung, 0.1% SDS); 2 x 15 min in Stringenz-Waschpuffer 2 (0.1 x SSC-Lösung, 0.1% SDS)).

Für die immunologische Detektion wurde die Membran zuerst für 30 min mit 50 mL 1 x Blocklösung (1 x Blocklösung: verdünnt aus 10 x Blocklösung (*Roche Diagnostics*)) in Maleinsäure-Puffer (0.1 M Maleinsäure pH 7.5, 0.15 M NaCl) geschwenkt. Die Inkubation mit der Antikörper-Lösung (50 mL) erfolgte ebenfalls bei Raumtemperatur für 30 min (Antikörper-Lösung: anti-digoxigenin Antikörper (*Roche Diagnostics*) 1:10 000 in 1 x Blocklösung verdünnt).

Die Membran wurde dann 2 x 15 min in Waschpuffer (0.1 M Maleinsäure pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.3% (v/v) Tween20)) und für 2-5 min in 50 mL Detektionspuffer (0.1 M Tris/HCl pH 9.5, 0.1 M NaCl) äquilibriert.

Unmittelbar vor der Detektion wurde die Membran in eine Folie gelegt und mit CDP-Star-Lösung versehen (CDP-Star (*Roche Diagnostics*) 1:2 000 in 2 mL Detektionspuffer).

Für die Visualisierung der RNA wurde ein Röntgenfilm (Kodak BioMax Light Film) für 10-30 min auf die Membran gelegt und dieser abschließend entwickelt.

2.7.7 RT-qPCR

2.7.7.1 cDNA-Synthese

Um RNA über eine PCR zu quantifizieren, muss diese zunächst unter Verwendung einer Reversen Transkriptase (Revert Aid H Minus reverse transcriptase (abgekürzt: RT); *Fermentas, Life Technologies*) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Hierfür wurden reverse *Primer* entworfen, die am 3'-Ende des zu detektierenden Bereiches hybridisieren (RT-*Primer*). Im Rahmen dieses Projektes wurde Gesamt-RNA aus Ebolavirus-infizierten HuH-7 Zellen isoliert, um aus dieser drei virale RNA-Spezies revers zu transkribieren: (i) das *leader*-Transkript, (ii) die virale mRNA des ersten Gens (NP) und (iii) das Antigenom. Die jeweiligen Oligonukleotide zur reversen Transkription sind in Tab. 7 gelistet. Der Ansatz und das Inkubationsprotokoll zur cDNA-Synthese werden in folgender Tabelle zusammengefasst (s. Tab. 30).

Tab. 30 Ansatz und Protokoll zur cDNA-Synthese

Komponente	Konzentration	Reaktion +RT	Reaktion -RT
Gesamt-RNA	-	1 µg	1 µg
<i>Primer</i>	10 µM	1.0 µL	1.0 µL
ddH ₂ O	-	ad 11.0 µL	ad 12.0 µL
Inkubation für 10 min bei 80 °C; anschließend Inkubation auf Eis			
RT buffer	5 x	4.0 µL	4.0 µL
dNTPs	10 mM jeweils	2.0 µL	2.0 µL
ddH ₂ O	-	2.0 µL	2.0 µL
Inkubation für 5 min bei 25 °C			
Reverse Transkriptase	200 U/µL	1.0 µL	-
Inkubation für 15 min bei 25 °C; 1 h bei 42 °C			
Hitzeinaktivierung für 10 min bei 70 °C			

Für jede RNA-Probe wurde eine Reaktion mit (+RT) und ohne (-RT) Zugabe von Reverser Transkriptase angesetzt, um die folgende Quantifizierung über qPCR auf unspezifische Amplifikationen (z.B. durch DNA-Kontaminationen) überprüfen zu können. Des Weiteren

wurde eine sogenannte Mock-Kontrolle verwendet, d.h. Gesamt-RNA, die aus nicht-infizierten, ansonsten jedoch identisch behandelten humanen Zellen isoliert wurde. Für diese RNA wurden ebenfalls cDNA-Synthesen durchgeführt (identisch zu den RNA-Proben mit viraler RNA). Bei *in vitro* Transkripten, die z.B. zur Kontrolle der Effizienz der folgenden PCR verwendet wurden, wurden 10 ng in der cDNA-Synthese eingesetzt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

2.7.7.2 Quantitative *real-time* PCR (qPCR)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene virale RNAs quantifiziert, indem sie zunächst zu cDNA umgeschrieben wurden (s. Kap. 2.7.7.1) und anschließend mittels quantitativer *real-time* PCR vermessen wurden. Die Quantifizierung erfolgte hierbei über einen Farbstoff (SYBR Green), der in doppelsträngige DNA interkaliert und somit eine messbare Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Menge an amplifizierter DNA zeigte. Der Reaktionsansatz einer qPCR wird in folgender Tabelle zusammengefasst (s. Tab. 31).

Tab. 31 Ansatz für eine quantitative *real-time* PCR.

Komponente	Volumen / μ L
cDNA (1:5)	4.0
2 x Absolute qPCR SYBR Green Mix (<i>Thermo Scientific, Life Technologies</i>)	10.0
Primer fwd. (5 μ M)	0.5
Primer rev. (5 μ M)	0.5
ddH ₂ O	5.0

Die hierbei verwendeten *Primer*-Paare wurden in Tab. 8 aufgeführt. Das Temperaturprogramm für die PCR wird in folgender Tabelle zusammengefasst (s. Tab. 32).

Tab. 32 Temperaturprogramm der quantitativen *real-time* PCR.

Schritt	Temperatur /°C	Zeit
Initialdenaturierung	95.0	15 min
Denaturierung	95.0	10 sec
Anlagerung	60.0	20 sec
Elongation	72.0	15 sec
Schmelzkurve	65.0-95.0	15 sec/ 1 °C

30 x

Abschließend wurden die resultierenden PCR-Produkte auf einem Agarosegel überprüft (s. Kap. 2.5.3.1).

2.8 Protein-Techniken

2.8.1 Expression und Aufreinigung von MBP-VP30₈₋₂₇₂

2.8.1.1 Expression von MBP-VP30₈₋₂₇₂

Das virale Protein 30 (VP30) wurde als Fusionsprotein mit MBP-*tag* (N-terminal) und leicht verkürzten N- und C-Termini hergestellt (Volllänge: 288 aa; hergestellt: aa 8-272), um die Löslichkeit des rekombinanten Proteins zu optimieren. Die Expression des MBP-VP30 Wildtyps (aa 8-272) erfolgte unter Verwendung von *E. coli* BL21 (DE3) Zellen, die zunächst mit dem entsprechenden Plasmid transformiert wurden (s. Kap. 2.4.6). Gleiches galt für die verschiedenen VP30-Varianten mit dem Unterschied, dass für diese die *E. coli* BL21 (DE3) pLysS Zellen verwendet wurden.

Für alle verwendeten MBP-VP30-Konstrukte fand die Expression unter gleichen Bedingungen statt: 250 mL LB-Medium wurden mit 6 mL Übernachtskultur der entsprechenden Zellen inokuliert und bei 37 °C und 180 rpm im Schüttelinkubator (GFL 3033) geschwenkt. Das Zellwachstum wurde durch regelmäßiges Messen der optischen Dichte OD₆₀₀ überprüft (s. Kap. 2.4.4). Bei einer OD₆₀₀ von 0.6-0.8 wurde die Proteinexpression mit 20% (w/v) L-Arabinose-Lösung (250 µL) induziert und die Zellen weitere 3 h unter Schütteln wachsen gelassen. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (4 000 rpm, 20 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.8.1.2 Native Aufreinigung von MBP-VP30₈₋₂₇₂

Zur Aufreinigung des Proteins wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und in 5 mL Resuspensions-Puffer aufgenommen (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 0.1% Triton; 1 x cOmplete UltraTablets (EDTA-free, Roche)). Der Zellaufschluss erfolgte an einer Sonotrode (*Branson Sonifier 250*; Einstellungen: Duty 50, Output 3) für 4 x 2 min. Dazwischen wurde die Zellsuspension für 2 min auf Eis gekühlt.

Danach wurde die Zellsuspension in Reagiergefäße überführt und die Zelltrümmer mittels Zentrifugation abgetrennt (13 000 rpm, 30 min, 4 °C). Die resultierenden Überstände wurden vereinigt und eine Probe (7.5 µL) für die Analyse mittels SDS-PAGE entnommen.

Unterdessen wurde die Amylose-Matrix (*New England Biolabs*) vorbereitet, indem 500 µL Matrix mit 500 µL Waschpuffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 200 mM NaCl) gemischt und zentrifugiert (4 000 rpm, 2 min) wurden. Nach Verwerfen des Überstandes wurde dieser Vorgang noch dreimal wiederholt, um die Matrix mit dem Waschpuffer vollständig zu äquilibrieren.

Die aus dem Zellaufschluss vereinigten Überstände wurden nun auf die äquilibrierte Amylose-Matrix gegeben (15 mL Röhre) und für 2 h bei 4 °C invertiert. Nach anschließender Zentrifugation (4 000 rpm, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand von der Matrix entfernt

(= Durchfluss) und eine Probe zur Analyse mittels SDS-PAGE entnommen. Die Amylose-Matrix wurde nun dreimal mit Waschpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine abzutrennen. Dafür wurde 1 mL Waschpuffer auf die Matrix gegeben, gemischt und erneut zentrifugiert (4 000 rpm, 5 min, 4 °C). Die Elution erfolgte mit Hilfe von Maltose in einem Stufengradienten von 1 mM, 5 mM und 10 mM Maltose. In der ersten Stufe wurde 1 mL des Elutionspuffers I (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 1 mM Maltose) auf die Matrix gegeben und diese für 30 min bei 4 °C invertiert. Durch Zentrifugation (4 000 rpm, 10 min, 4 °C) wurde das erste Eluat vorsichtig abgetrennt, von der Matrix abgenommen und in einem Reagiergefäß auf Eis aufbewahrt. Nun wurde Elutionspuffer II hinzugegeben (s. Elutionspuffer I mit 5 mM Maltose).

Nach gleicher Inkubation, Zentrifugation und Abtrennung wurden schließlich 500 µL Elutionspuffer III (s. Elutionspuffer I mit 10 mM Maltose) hinzugegeben, erneut für 30 min bei 4 °C invertiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand von der Matrix entfernt und diese verworfen.

Die drei gewonnenen Eluate wurden 1:1 mit Glycerin (99.5%; Endkonzentration: 50%) versetzt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -20 °C gelagert.

Die Aufreinigung und Reinheit der gewonnenen Proteinproben wurde anschließend mittels SDS-PAGE überprüft (s. Kap. 2.8.5), wobei Proben aus folgenden Arbeitsschritten aufgetragen wurden: Durchfluss, Waschfraktion, Eluat 1 (1 mM Maltose), Eluat 2 (5 mM Maltose) und Eluat 3 (10 mM Maltose). Die Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford bestimmt (s. Kap. 2.8.3).

2.8.1.3 Denaturierende Aufreinigung von MBP-VP30₈₋₂₇₂

Als Alternative zur nativen Aufreinigung wurde ein Protokoll zur denaturierenden Aufreinigung von MBP-VP30₈₋₂₇₂ etabliert. Dies diente u.a. zur Kontrolle, ob zelluläre RNAs, die bei der nativen Aufreinigung evtl. an VP30 haften bleiben, Einfluss auf die folgenden Bindungsstudien haben könnten (s. Kap. 2.10.1 und 2.10.2).

Bis zur Elution wurde das Protokoll aus Kap. 2.8.1.2 befolgt. Die Elution des Proteins von der Amylose-Matrix erfolgte in diesem Fall in nur einer Stufe unter Verwendung von 1 mL Elutionspuffer III (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 10 mM Maltose). Das gewonnene Eluat wurde im Verhältnis 1:1 mit denaturierendem (denat.) Basispuffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 8 M Urea, 5 mM EDTA, 1 mM DTT) vermischt. Zugleich wurden 500 µL Ni-NTA-Matrix (*Qiagen*) mit denat. Basispuffer äquilibriert, indem sie dreimal damit gewaschen wurde. Das denat. Eluat wurde auf die Ni-NTA-Matrix gegeben und für 2 h bei 4 °C invertiert. Anschließend wurde zentrifugiert (4 000 rpm, 10 min, 4 °C) und der Überstand (= Durchfluss) zur Analyse mittels SDS-PAGE aufbewahrt. Die Matrix wurde zweimal mit denaturierendem Basispuffer gewaschen und abschließend mit 1 mL Ni-NTA-

Elutionspuffer (= denat. Basispuffer + 500 mM Imidazol) eluiert, indem 30 min bei 4 °C invertiert wurde. Das Eluat wurde erneut über Zentrifugation (4 000 rpm, 10 min, 4 °C) von der Matrix abgetrennt und anschließend einer Rückfaltung mittels Dialyse unterzogen. Hierfür wurde das Eluat in einen Dialyseschlauch (MWCO 6 000- 8 000; *Roth*), der zuvor in dest. H₂O aufgekocht wurde, gefüllt. Dieser wurde in ca. 1 L Dialysepuffer gegeben (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM ZnCl₂) und langsam bei 4 °C gerührt. Es erfolgten zwei Wechsel des Dialysepuffers nach jeweils 1 h Inkubation. Die abschließende Dialyse erfolgte über Nacht bei 4 °C unter Rühren.

Die Lösung wurde aus dem Dialyseschlauch entnommen und auf eine mit Waschpuffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 200 mM NaCl) äquilibrierte Amylose-Matrix gegeben. Es erfolgte erneut ein zweistündiges Invertieren bei 4 °C. Nach Zentrifugation (4 000 rpm, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und die Matrix mit 500 µL Elutionspuffer III für 1h bei 4 °C invertiert. Abschließend wurde bei 4 000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, das finale Eluat von der Matrix entfernt und bei -20 °C gelagert.

Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Assay (s. Kap. 2.8.3) bestimmt und die Aufreinigung bzw. Reinheit über eine SDS-PAGE analysiert (s. Kap. 2.8.5).

2.8.2 Expression und Aufreinigung von VP30_{CTD}

Die Expression und Aufreinigung der C-Domäne von VP30 (aa 142-272) wurde in Anlehnung an das bereits publizierte Protokoll von Hartlieb et al. [107] durchgeführt. Das Plasmid (pProEx HTb_VP30_{CTD}) wurde in chemisch-kompetente *E. coli* Rosetta (DE3) Zellen eingebracht. Die Expression erfolgte in LB-Medium, indem 250 mL mit 6 mL Über-Nacht-Kultur inokuliert wurden. Das Zellwachstum wurde über Messungen der optischen Dichte OD₆₀₀ verfolgt (s. Kap. 2.4.4), wobei die Induktion der Proteinexpression in der Expressionskultur bei einer OD₆₀₀ von ~ 0.6 mit 250 µL IPTG (1 M; Endkonzentration: 1 mM) erfolgte. Die Expressionskultur wurde weitere 3 h bei 37 °C geschüttelt, anschließend pelletiert (4 000 rpm, 10 min, 4°C), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die Aufreinigung wurden die Zellpellets auf Eis aufgetaut und in 5 mL Lysepuffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 3-5 mM β-Mercaptoethanol, 1 x cOmplete UltraTablets (EDTA-free, *Roche*)) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte an einer Sonotrode (*Branson Sonifier 250*; Einstellungen: Duty 50, Output 3) für 4 x 2 min. Dazwischen wurde die Zellsuspension für 2 min auf Eis gekühlt.

Danach wurde die Zellsuspension in Reagiergefäße überführt und die Zelltrümmer mittels Zentrifugation abgetrennt (13 000 rpm, 30 min, 4 °C). Die resultierenden Überstände wurden vereinigt und eine Probe (7.5 µL) für die Analyse mittels SDS-PAGE entnommen. Währenddessen wurde die Ni-NTA-Matrix (*Qiagen*) vorbereitet, indem sie mit Waschpuffer I

(50 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 3-5 mM β -Mercaptoethanol) dreimal gewaschen wurde (Zentrifugation: 4 000 rpm, 2 min). Die vereinigten Überstände wurden auf die Matrix gegeben und für 2 h bei 4 °C invertiert. Nach Zentrifugation (4 000 rpm, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand (= Durchfluss) entfernt und die Matrix einmal mit Waschpuffer II (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 M NaCl, 3-5 mM β -Mercaptoethanol) und zweimal mit Waschpuffer I gewaschen. Die Elution erfolgte in zwei Stufen über die Zugabe von Imidazol. Zuerst wurde 1 mL Elutionspuffer I (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 3-5 mM β -Mercaptoethanol, 50 mM Imidazol) zur Matrix hinzugegeben und für 30 min invertiert. Nach Zentrifugation (4 000 rpm, 10 min, 4 °C) wurde das erste Eluat entfernt und für die finale Elution 0.5 mL Elutionspuffer II (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 3-5 mM β -Mercaptoethanol, 250 mM Imidazol) für weitere 30 min Rotation hinzugegeben. Erneut wurde zentrifugiert (4 000 rpm, 10 min, 4 °C) und das Eluat entnommen. Das finale Eluat (250 mM Imidazol) wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -20 °C gelagert.

Die Aufreinigung wurde anschließend mittels SDS-PAGE (s. Kap. 2.8.5) überprüft, wobei Proben aus den folgenden Bearbeitungsschritten aufgetragen wurden: Durchfluss, Waschfraktion, Eluat 1 (50 mM Imidazol), Eluat 2 (250 mM Imidazol). Diese VP30-Variante wurde anschließend ankonzentriert (s. Kap. 2.8.4) und die Konzentration mittels Bradford-Assay bestimmt (s. Kap. 2.8.3).

2.8.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde nach der so genannten Bradford-Methode unter Verwendung des Bradford-Reagenz (*Bio-Rad*) bestimmt. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass basische und unpolare Aminosäuren im sauren Milieu einen Komplex mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue G-250 bilden. Durch den gebildeten Komplex verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 auf 595 nm; die Messung der Konzentration erfolgt demnach bei 595 nm [109].

Tab. 33 Pipettier-Schema für die Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford.

	Blank	1	2	3	4	5	6	Protein-probe
Proteingehalt / $\mu\text{g/mL}$	-	2	4	6	8	10	20	?
BSA / μL	-	20	40	60	80	100	200	Proteinprobe 3-10
ddH ₂ O / μL	800	780	760	740	720	700	600	800 -Proteinprobe
Bradford-Reagenz / μL	200	200	200	200	200	200	200	200

Zunächst wurde aus einer BSA-Standardlösung (100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) eine Referenzkurve erstellt, der die bekannten Konzentrationen von verschiedenen BSA-Verdünnungen zugrunde lagen.

Sobald das Bradford-Reagenz zugegeben wurde, wurde gründlich gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Pipettier-Schema ist in Tab. 33 zusammengefasst.

Die Lösung wurde anschließend in eine transparente Halbmikroküvette (*Sarstedt*) gegeben und im Photometer (*Biomate 3*) vermessen. Die dabei entstehende Kalibrierkurve diente als Referenz für die zu bestimmende Konzentration der Proteinprobe. In der Regel wurden zwei verschiedene Volumina der Proteinprobe vermessen (3-10 µL) und anstelle der BSA-Lösung, wie im obigen Pipettier-Schema gezeigt, pipettiert.

2.8.4 Ankonzentrieren von Proteinproben

Wenn es notwendig war die Proteinkonzentration zu erhöhen, wurde dies mit Zentrifugen-Konzentratoren (*Amicon[®] Ultra, Centrifugal Filters*) durchgeführt (z.B. für VP30_{CTD}). Bei diesen Konzentratoren ist es wichtig auf den *cut-off* (= Ausschlussgröße) des Konzentrators zu achten, der die molekulare Masse angibt, die den Filter passieren kann. In diesem Fall wurden Konzentratoren mit einem *cut-off* von 10 kDa verwendet. Die Proteinprobe (500 µL) wurde in den Konzentrator gefüllt und so lange bei 5 000 rpm (4 °C) zentrifugiert, bis sie auf ein Volumen von ca. 50 µL eingeeengt worden war. Nach jeweils 5-10 minütiger Zentrifugation wurde die Proteinlösung vorsichtig auf- und abpipettiert, um eine homogene Verteilung zu gewährleisten und eine Präzipitation an der Konzentrator-Membran zu verhindern.

Anschließend wurde die Konzentration der Proteinlösung mittels Bradford-Assay bestimmt (s. Kap. 2.8.3) und die Qualität bzw. Reinheit des Proteins über eine SDS-PAGE ermittelt (s. Kap. 2.8.5).

2.8.5 SDS-PAGE

Mit Hilfe einer SDS-PAGE (engl: Sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) können Proteine nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt werden.

Dafür wurden die Proteinproben zunächst durch Zugabe eines Probenpuffers (125 mM Tris/HCl pH 6.8, 4% SDS (w/v), 1.4 M β-Mercaptoethanol, 0.05% Bromphenolblau) und Erhitzen auf 95 °C für 5 min denaturiert. Essentiell sind hier β-Mercaptoethanol (zum Aufbrechen der Disulfidbrücken) und das negativ geladene Detergenz SDS, das sich an die Aminosäuren anlagert und die Eigenladung des Proteins maskiert. Durch diese Vorbehandlung können Proteine unabhängig von ihrer Struktur mittels Elektrophorese aufgetrennt werden, wobei zwischen der Mobilität und der Größe der Proteine ein logarithmischer Zusammenhang besteht. Auch bei dieser Elektrophorese wird ein Größenstandard als Referenz aufgetragen (*PageRuler Plus Prestained Protein Ladder*, 10-250 kDa; *Fermentas, Thermo Scientific*). Im Rahmen dieser Arbeit wurden 15%ige SDS-Gele verwendet, deren Zusammensetzung in folgender Tabelle (s. Tab. 34) aufgelistet wird.

Tab. 34 Zusammensetzung von 15%igen SDS-Gelen.

Komponente	Trenngel	Sammelgel
4 x Trenngelpuffer (1.5 M Tris/HCl pH 8.8, 0.6% SDS (w/v))	4 mL	-
4 x Sammelgelpuffer (0.5 M Tris/HCl pH 6.8, 0.6% SDS (w/v))	-	1.8 mL
Acrylamid/Bisacrylamid (30% Lösung)	8 mL	1 mL
APS (10% (w/v) Lösung)	160 µL	75 µL
TEMED	16 µL	7.5 µL
ddH ₂ O	ad 16 mL	ad 7.5 mL

Die Elektrophorese wurde in 1 x SDS-Laufpuffer (verdünnt aus Rotiphorese[®] 10 x SDS-PAGE; *Roth*) für ca. 1 h bei 180 V durchgeführt.

Zum Visualisieren erfolgte eine Anfärbung der Gele mit Coomassie-Brilliant-Blue G 250 für ca. 30 min. Zum Entfärben wurde das Gel für mehrere Stunden in dest. H₂O geschwenkt und abschließend mit einem Scanner (GS-800 Calibrated Densitometer; *Bio-Rad*) dokumentiert. Zur spezifischen Detektion eines einzelnen Proteins wurde ein Western Blot durchgeführt (s. Kap. 2.8.6).

2.8.6 Western Blot

Über einen so genannten Western Blot besteht die Möglichkeit nach einer Elektrophorese (SDS-PAGE; s. Kap. 2.8.5) die Proteine auf einer Membran zu immobilisieren und mit Hilfe von spezifischen Antikörpern über Chemolumineszenz ein bestimmtes Protein (hier: VP30) nachzuweisen.

Dabei wurde das SDS-Gel nach Beendigung der Elektrophorese in Transferpuffer (25 mM Tris/HCl pH 8.3, 192 mM Glycin, 10% Methanol (v/v)) geschwenkt, ebenso wie zwei Filterpapiere (*Bio-Rad*). Die Immobilon[®]-P PVDF-Membran (*Millipore*) wurde mittels Inkubation in Methanol (15 sec) aktiviert, anschließend in ddH₂O für 1 min gewaschen und ebenfalls in Transferpuffer geschwenkt. Für das Blotten wurden nun ein Filterpapier, die Membran, das Gel und das zweite Filterpapier in dieser Reihenfolge luftblasenfrei übereinander in die Blotting-Apparatur (Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Transfer Cell; *Bio-Rad*) gelegt und für 30 min 10 V angelegt. Danach wurde die Membran für 2 h in 5% (w/v) Milchpulver-Lösung (in TBST-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20 (v/v)) geschwenkt und mit TBST-Lösung (dreimal, jeweils 10 min) gewaschen. Der 1. Antikörper wurde für 1 h bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben (anti-VP30 *rabbit*: 1:500 in TBST-Puffer). Es folgte erneut dreimaliges Waschen der Membran mit TBST-Puffer und die Inkubation mit dem 2. Antikörper (anti-*rabbit* POD: 1:20 000 in TBST-Puffer). Danach wurde abschließend dreimal mit TBST-Puffer gewaschen. Die Detektion erfolgte unter

Verwendung der WesternLightning® Plus-ECL (Enhanced; *PerkinElmer*) nach Herstellerangaben. Für die Detektion der Chemolumineszenz wurde ein Film (Kodak® BioMax™) für 1-3 min auf die Membran aufgelegt und unter Verwendung von Entwickler (Kodak® GBX Developer) und Fixierer (Kodak® GBX Fixer) visualisiert.

2.8.7 Abspaltung des MBP-tag mittels TEV-Protease

Für die Bindungsanalyse von VP30 wurde vor Durchführung der Experimente der MBP-tag mittels TEV (*Tobacco Etch Virus*; *Invitrogen*™) Protease abgespalten. Hierfür wurde der folgende Ansatz zusammengegeben (s. Tab. 35). Der Ansatz wurde bei 4 °C über Nacht inkubiert und der Erfolg der Abspaltung mittels SDS-PAGE überprüft (s. Kap. 2.8.5).

Tab. 35 Ansatz für die Abspaltung des MBP-tags mittels TEV-Protease.

Komponente	Menge
MBP-VP30	20 µg
20 x TEV Puffer	2.5 µL
DTT (100 mM)	0.5 µL
TEV-Protease	1.0 µL
Tris/Glycerin*	ad 50 µL

*Tris/Glycerin: Tris-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 200 mM NaCl) im 1:1 Gemisch mit Glycerin

VP30, das mit TEV behandelt wurde, wurde maximal eine Woche für Bindungsanalysen verwendet und während dieser Zeit bei -20 °C gelagert.

2.9 Analyse von RNA-Sekundärstrukturen

2.9.1 Bioinformatische Vorhersage

Für die Vorhersage von RNA-Sekundärstrukturen wurden entweder die ViennaRNA Web Services (RNAfold; s. Kap. 2.11.4) oder mfold (s. Kap. 2.11.5) verwendet. Diese Vorhersagen dienten als Basis für die experimentelle Bestimmung der Strukturen.

2.9.2 Experimentelle Strukturanalyse

Für die experimentelle Strukturanalyse wurden chemische und enzymatische Sonden verwendet. In dieser Arbeit kam als enzymatische Sonde die RNase T1 (1 000 U/µL; *Fermentas*, *Thermo Scientific*) zum Einsatz, die spezifisch nach ungepaarten Guanosinen spaltet. Diese RNase kann sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen verwendet werden, um so die Zugänglichkeiten der Guanosine unter den

verschiedenen Bedingungen zu vergleichen und als Orientierung bei der Zuordnung der Spaltprodukte zu dienen.

Als chemische Sonden wurden i.d.R. Blei(II)-Ionen (aus $\text{Pb}(\text{OAc})_2$) verwendet. Diese sind in der Lage einzelsträngige bzw. leicht zugängliche Regionen der zu untersuchenden RNA spezifisch zu spalten.

Unter Verwendung einer alkalischen Hydrolyse wurde eine sogenannte Alkali-Leiter (auch OH-Leiter genannt) generiert, die Spaltprodukte nach jedem Nukleotid erzeugt und damit (zusammen mit der denaturierenden RNase T1-Spaltung) als Referenz bei der Zuordnung der erhaltenen Fragmente diente.

Bei der Durchführung dieser Strukturanalyse war es zunächst essentiell eine homogene RNA zu generieren. Dafür wurden die radioaktiv markierten RNAs (154-1_HH bzw. 2-158_HH) in TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 6.5, 1 mM EDTA, 20 mM Ammoniumacetat) zurückgefaltet (Ansatz s. Tab. 36), indem für 5 min auf 95 °C erhitzt wurde, die RNAs anschließend für 5 min auf Eis inkubiert und dann 20 min auf Raumtemperatur gebracht wurden. Die Homogenität der RNAs wurde anschließend auf einem nativen PAA-Gel überprüft.

Tab. 36 Zusammensetzung des Ansatzes für eine RNA-Rückfaltung.

Komponente	Volumen
RNA (^{32}P -markiert)	0.5 μL
RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	1.0 μL
2 x TE Puffer	4.0 μL
ddH ₂ O	2.5 μL

Die Inkubation mit den verschiedenen oben beschriebenen Sonden für die Strukturanalyse erfolgte auf Basis der rückgefalteten RNA und ist in den folgenden Tabellen zusammengefasst (s. Tab. 37-Tab. 40).

Tab. 37 Ansatz und Inkubation für die native RNase T1-Spaltung.

Komponente	Volumen
RNA (rückgefaltet)	1.0 μL
5 x TN-Puffer*	1.0 μL
RNase T1 (1 000 U/ μL ; 1:50 000)	1.0 μL
ddH ₂ O	2.0 μL
Inkubation	37 °C für 2-5 min

*5 x TN-Puffer: 100 mM Tris-acetat pH 8.0, 500 mM NaCl

Tab. 38 Ansatz und Inkubation für die denaturierende RNase T1-Spaltung.

	Komponente	Volumen
	RNA (rückgefaltet)	1.0 µL
	5 x TN-Puffer*	1.0 µL
	RNase T1 (1 000 U/µL; 1:500/1:5000)	1.0 µL
	8 M Urea-Lösung	2.0 µL
Inkubation	55 °C für 2-5 min	

*5 x TN-Puffer: 100 mM Tris-acetat pH 8.0, 500 mM NaCl

Tab. 39 Ansatz und Inkubation der Pb(II)-Spaltung.

	Komponente	Volumen
	RNA (rückgefaltet)	1.0 µL
	5 x TN-Puffer*	1.0 µL
	Pb(II)-Lösung (2 mM)**	1.0 µL
	ddH ₂ O	2.0 µL
Inkubation	RT für 15-17 min	

*5 x TN-Puffer: 100 mM Tris-acetat pH 8.0, 500 mM NaCl

** frisch verdünnt aus 50 mM Pb(OAc)₂-Lösung**Tab. 40** Ansatz und Inkubation der OH-Leiter.

	Komponente	Volumen
	RNA (rückgefaltet)	1.0 µL
	10 x Alkali-Puffer*	0.5 µL
	ddH ₂ O	3.5 µL
Inkubation	95 °C für 2-3 min	

*10 x Alkali-Puffer: 0.1 M Na₂CO₃, 0.1 M NaHCO₃

Die verschiedenen Reaktionen wurden stets mit der Zugabe von 5 µL 2 x denaturierenden Probenpuffers (s. Tab. 11) abgestoppt.

Die Analyse der Spaltprodukte erfolgte auf einem denaturierenden PAA-Gel (s. Kap. 2.5.3.2). Hierbei wurden der Polyacrylamid-Anteil und die Laufzeiten so variiert (wird bei den jeweiligen Gelen im Ergebnisteil angegeben), dass die verschiedenen Bereiche nukleotidgenau aufgelöst werden konnten. Außerdem wurde sowohl 5'- als auch 3'-markierte RNA verwendet (s. Kap. 2.5.4), um die Analyse über die gesamte RNA erstrecken zu können.

Die Gele wurden nach Beendigung der Gelelektrophorese stets für 1 h bei 80 °C in einem Vakuum Getrockner (Model 483 Slab Dryer; *Bio-Rad*) getrocknet und eine *imaging plate* über Nacht aufgelegt.

2.10 Analyse von RNA:DNA- und RNA:Protein-Interaktionen

Eine Kernfragestellung dieser Arbeit betraf Interaktionen zwischen RNA und Protein (in diesem Fall VP30). Hierfür wurden zwei verschiedene Ansätze verwendet, die im Folgenden detailliert beschrieben werden.

2.10.1 DRaCALA

Zur Untersuchung von RNA:Protein-Interaktionen wurde ein Assay verwendet, der eine Abwandlung des Filter-Bindungs-Assays darstellt, der sogenannte DRaCALA (*Differential Radial Capillary Action of Ligand Assay*; [110,111]). Das Prinzip beruht auf der Tatsache, dass auf freie Nukleinsäuren größere kapillare Kräfte wirken als auf RNA:Protein-Komplexe und sie damit stärker auf der Membran diffundieren. Wurde die RNA radioaktiv markiert, konnte ein RNA:Protein-Komplex daher als zentraler dunkler Punkt auf der Membran im Inneren des radioaktiven Signals detektiert werden, wie es im folgenden Schema abgebildet ist (s. Abb. 16) .

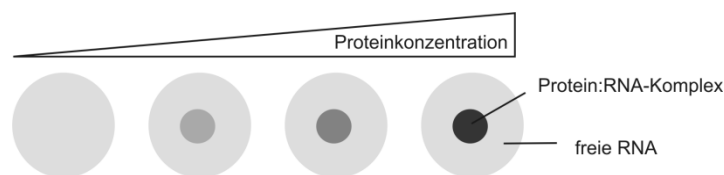


Abb. 16 Schema eines DRaCALA. Die freie RNA erfährt größere kapillare Kräfte und diffundiert nach außen. Ein RNA:Protein-Komplex dagegen bleibt im Zentrum des radioaktiven Signals.

Die radioaktiv-markierte RNA wurde 1:50 im Protein-Lagerpuffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 200 mM NaCl) verdünnt und anschließend rückgefaltet (95 °C 5 min, Eis 5 min, RT 20 min). Zur RNA wurde dann Protein-Lösung zugegeben, der Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran (*GE Healthcare*) pipettiert (Pipettierschema s. Tab. 41). Die Membran wurde für 20 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend für 2 h mit einer *imaging-plate* bedeckt. Die Auswertung der Signale fand nach Einscannen der *imaging-plate* mit Hilfe der Aida-Software (Version 3.45) statt.

Bei diesem Assay wurden sowohl MBP-VP30- als auch TEV-behandelte VP30-Varianten sowie verschiedenste RNA-Substrate verwendet, um das unterschiedliche Bindungsverhalten qualitativ beurteilen zu können. Als Kontrollen wurden MBP- und BSA-Lösungen anstelle von VP30 verwendet.

2.10.2 EMSA

Ein EMSA (*E*lectrophoretic *M*obility *S*hift *A*ssay) ist eine Standardmethode, um Nukleinsäurehybride (z.B. RNA:DNA-Komplexe) oder Nukleinsäure:Protein-Komplexe (z.B. RNA:VP30-Komplexe) unter nativen Bedingungen zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Varianten verwendet, die im Folgenden vorgestellt werden.

2.10.2.1 EMSA unter Standardbedingungen

Die hier beschriebene Variante des EMSA wurde für die Detektion von Nukleinsäure-Komplexen (z.B. DNA:DNA-, DNA:RNA- oder RNA:RNA-Komplexe) verwendet. Diese wurden zunächst mit Hilfe des unter Kap. 2.7.5 beschriebenen Hybridisierungsprogrammes aneinander angelagert. Die Komplexe wurden dann über ein natives PAA-Gel (s. Kap. 2.5.3.2) auf TBE-Puffer-Basis aufgetrennt, wobei die Detektion entweder über EtBr-Färbung oder Autoradiographie erfolgte (s. Kap. 2.5.5). Im Fall der Autoradiographie war eine der beiden verwendeten Nukleinsäuren radioaktiv markiert.

Eine Komplexbildung konnte in einem solchen Ansatz dadurch erkannt werden, dass Nukleinsäure-Hybride eine veränderte elektrophoretische Mobilität als das einzelsträngige Pendant aufwiesen.

2.10.2.2 EMSA unter modifizierten Bedingungen

Unter den in Kap. 2.10.2.1 beschriebenen Bedingungen war es nicht möglich RNA:VP30-Komplexe zu detektieren. Dies könnte u.a. an den verwendeten Pufferbedingungen (TBE-Puffer), aber auch an der Quervernetzung der Maschen durch die verwendete Acrylamid/M-Bis-Lösung (24:1; 50%) liegen (Quervernetzung: 4%).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine modifizierte Variante des EMSA etabliert, mit der nicht nur RNA:VP30-Komplexe sichtbar gemacht werden konnten, sondern die auch auf andere virale RNA-bindende Proteine (z.B. VP35 (EBOV), N (RVFV)) anwendbar war (s. Kap. 3.1).

Im Vergleich zum „Standard“-EMSA wurden folgende Parameter verändert: (i) es wurde ein zwei-stufiges PAA-Gel gegossen (untere $\frac{3}{4}$ 10% PAA-Lösung, obere $\frac{1}{4}$ 4% PAA-Lösung), wobei eine 40%-ige Acrylamid/M-Bis-Lösung (37.5:1) verwendet wurde, die zu einer 2.6%igen Quervernetzung (und damit zu größeren Maschen) führte; (ii) die Gele wurden auf Basis eines 1 x *Shift*-Puffers (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 200 mM NaAc) gegossen; (iii) als Laufpuffer wurde 0.5 x *Shift*-Puffer verwendet; (iv) es wurde kein nativer RNA-Probenpuffer verwendet, sondern die Proben ohne zusätzlichen Probenpuffer auf das Gel auftragen, da sie *per se* 25% Glycerin (v/v) enthielten. In folgender Abbildung wird das Schema dieser EMSA-Variante dargestellt (s. Abb. 17).

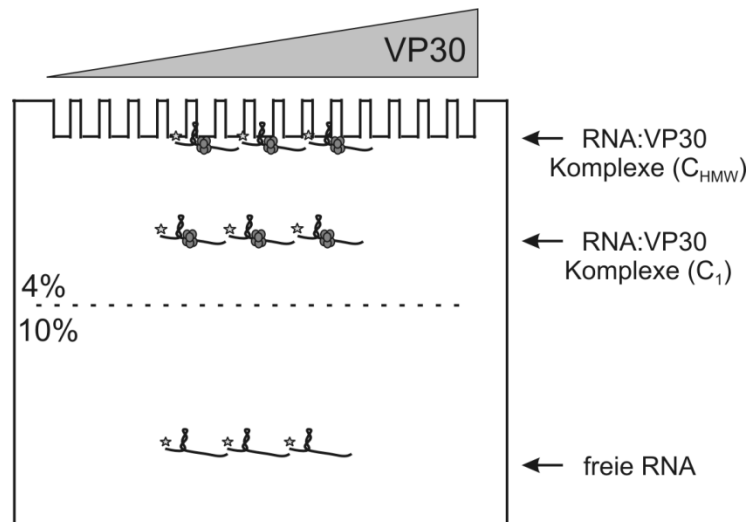


Abb. 17 Schema des modifizierten EMSAs zur Detektion der RNA:VP30-Komplexe. Das Gel besteht aus zwei Stufen (4% und 10% PAA-Lösung). Während die freie RNA eine größere Mobilität zeigt, können die RNA:VP30-Komplexe in der 4%-Stufe detektiert werden.

Für die RNA:VP30-Komplexbildung wurde die jeweilige radioaktiv-markierte RNA in Protein-Lagerpuffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 200 mM NaCl) 1:50 verdünnt und anschließend rückgefaltet (95 °C 5 min, Eis 5 min, RT 20 min). Zur RNA wurde dann Protein-Lösung in verschiedenen Konzentrationen (im Fall von VP30₈₋₂₇₂: 0 - 2.7 µM) zugegeben, die vorher einer Spaltung mittels TEV-Protease (s. Kap. 2.8.7) unterzogen wurde. Als Kontrolle wurde MBP-Lösung (8 µM) verwendet.

In der folgenden Tabelle sind die verschiedenen verwendeten VP30-Konzentrationen bzw. Proben als Pipettier-Schema aufgelistet (s. Tab. 41).

Tab. 41 Pipettier-Schema des EMSA zur Detektion von RNA:VP30-Komplexen.

VP30 /µL	VP30 /µM	RNA (rückgefaltet) /µL	Tris/Glycerin*
5.0	2.7	5.0	-
3.0	1.6	5.0	2.0
2.0	1.1	5.0	3.0
1.0	0.5	5.0	4.0
3.25 (1:5)	0.4	5.0	1.75
1.5 (1:5)	0.2	5.0	3.5
3.5 (1:20)	0.1	5.0	1.5
5.0 (MBP)	0.0	5.0	-

*Protein-Lagerpuffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 200 mM NaCl)/Glycerin im Verhältnis 1:1

Die Elektrophorese wurde bei 4 °C für 8 h 15 min durchgeführt, über Nacht wurde zur Detektion der Komplexe über Autoradiographie eine *imaging-plate* aufgelegt. Die Quantifizierung der freien RNA und der verschiedenen RNA:VP30-Komplexe (C₁ und C_{HMW}; s. Abb. 17) wurde mit Hilfe der Aida-Software (Version 3.45) durchgeführt. Über das

Verhältnis der freien zur komplexierten RNA konnten die Affinitäten über die Bestimmung des K_d -Wertes ermittelt werden.

2.11 Verwendete Software und Bioinformatische Programme

Für die Auswertung, Bildbearbeitung und bioinformatische Vorhersagen wurden verschiedene Programme verwendet, die im Folgenden genauer aufgeschlüsselt werden.

2.11.1 GraFit

Die Software GraFit wurde verwendet, um die Quantifizierung der radioaktiven Signale (z.B. nach einem EMSA, s. Kap. 2.10.2) zu plotten, diese Daten mit einer entsprechenden Gleichung zu fitten und somit Dissoziationskonstanten (K_d -Werte) zu ermitteln. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die GraFit Version 5.0.13 genutzt.

2.11.2 CorelDRAW Graphics Suite

Das CorelDRAW Grafik-Programm (Version 11.633) wurde verwendet, um Abbildungen und Graphen zu erstellen und zu bearbeiten.

2.11.3 National Center for Biotechnology Information (NCBI)

Auf der NCBI-Plattform wurde die Datenbank *PubMed* für Literaturrecherche verwendet. In dieser Datenbank sind relevante Publikationen aller Disziplinen auf dem Gebiet der Lebenswissenschaften hinterlegt. Desweiteren wurden die Datenbanken *Genome*, *Nucleotide* und *Protein* genutzt, um Informationen zu Sequenzen und Annotationen von Genen und Proteinen zu erhalten [112].

Ein weiteres Programm, das von NCBI zur Verfügung gestellt wird, ist BLAST (Basic Local Alignment Tool). Damit wurden u.a. Alignments auf Nukleotid-Basis (blastn) erstellt, um Sequenzierungen auszuwerten oder konservierte Bereiche in Genomen zu visualisieren. Eine weitere Anwendung bot BLAST mit dem Alignment von Aminosäuresequenzen (blastp), um konservierte Bereiche verschiedener Proteine zu ermitteln [113].

2.11.4 ViennaRNA Web Services

Aus den verschiedenen Angeboten des ViennaRNA Web Services [114] wurde in erster Linie RNAfold zur Vorhersage von RNA-Sekundärstrukturen verwendet [115]. Zusätzlich besteht bei diesem Programm die Möglichkeit durch Eingabe verschiedener Temperaturen, einen

Temperaturverlauf der RNA-Strukturen zu simulieren und somit einen Eindruck von der Stabilität der Strukturelemente zu erhalten.

2.11.5 Mfold Web Server

Der `mfold` Web Server [116] ist eine Alternative zu `RNAfold` (s. Kap. 2.11.4), um RNA- oder DNA-Strukturen vorherzusagen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Programm verwendet, um die Stabilität einer vorhergesagten RNA-Struktur anhand des hier kalkulierten ΔG -Wertes einschätzen zu können.

2.11.6 IDT OligoAnalyzer 3.1

Der `OligoAnalyzer 3.1` wird von *Integrated DNA Technology* (IDT) zur Verfügung gestellt [117] und wurde im Rahmen dieser Arbeit zum Design von Oligonukleotiden (*Primer*, Sonden u.a.) verwendet. Er bietet die Möglichkeit neben Schmelzpunktbestimmung auch die Bildung von Sekundärstrukturen, Homo- und Heterodimeren zu kalkulieren.

2.11.7 Clustal W2

`ClustalW2` [118] ist ein Programm des *European Bioinformatics Institute* (EBI) des EMBL, mit dem man multiple Alignments durchführen kann. Bei dieser Arbeit wurde es vor allem zum Alignment der Aminosäuressequenzen von VP30 verschiedener Ebolavirus-Spezies und der verschiedenen Ebolavirus-Genome verwendet, um konservierte Regionen zu ermitteln.

2.11.8 ExPASy Bioformatics Resources Portal (SIB)

Das ExPASy-Portal bietet eine Vielzahl an Programmen für die unterschiedlichsten Anwendungen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Programme `Translate` und `Protparam` verwendet. `Translate` dient dazu eine Nukleinsäure-Sequenz in die dazugehörige Aminosäure-Sequenz (in den sechs möglichen Leserastern) zu übersetzen. Mit Hilfe von `Protparam` können auf Basis einer Aminosäuresequenz die wichtigsten Proteinparameter kalkuliert werden (Molekulargewicht, isoelektrischer Punkt u.a.) [119].

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Etablierung eines Bindungsassays (EMSA) zur Detektion von RNA:VP30-Komplexen

Die Grundvoraussetzung zur Untersuchung der RNA-Bindung von VP30 bestand darin einen Assay zu etablieren, der eine Detektion und Quantifizierung von RNA:VP30-Komplexen ermöglichte. Die Bindungsstudien sollten auf Basis eines *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) durchgeführt werden, der neben der Durchführung unter nativen Bedingungen auch eine Auftrennung verschiedener RNA:Protein-Komplexpopulationen zulässt.

3.1.1 DRaCALA als Basis für Untersuchungen der RNA:VP30-Interaktion

Um die Untersuchung der RNA:VP30-Bindung mittels EMSA zu etablieren, war es notwendig eine Methode als Referenz mit einzubeziehen. Hierfür wurde der sogenannte DRaCALA (*Differential Radial Capillary Action of Ligand Assay*; s. Kap. 2.10.1 und [110,111]) verwendet, der es aufgrund seiner sehr einfachen und schnellen Durchführung ermöglichte, RNA:VP30-Komplexe zu detektieren und verschiedene Substrat- und Proteinvarianten vorab auf ihr Bindungsverhalten hin zu testen.

Für die *in vitro* Untersuchungen der RNA:VP30-Bindung wurde VP30 als MBP-Fusionsprotein hergestellt und aufgereinigt (s. Kap. 2.8.1). Als in Frage kommende Bindungspartner wurden die 3'-terminalen 154 Nukleotide des Genoms sowie dessen antigenomisches Pendant gewählt, die sich beide als bindungsaktiv erwiesen (s. Abb. 18 A). Daneben wurden weitere virale und nicht-virale RNA-Substrate auf ihre Bindung an MBP-VP30 getestet. Beispielhaft ist hier ein bindungskompetentes nicht-virales Substrat (Vorläufer-tRNA Glycin (ptRNA^{Gly}) aus *Thermus thermophilus*) gezeigt, während für ein virales mRNA-Substrat (nt 56-158 auf Antigenom-Ebene) sowie Haarnadelstrukturen aus dem Bereich der 3'-*leader*-Region auf Genom- und Antigenomebene (nt 54-88 und nt 80-46) keine Interaktion festgestellt werden konnte (s. Abb. 18 A und B).

An dieser Stelle sei erwähnt, dass der DRaCALA im Rahmen dieser Arbeit als Referenz für eine qualitative Beurteilung der RNA-Substrate und Proteinvarianten verwendet wurde, für die Bestimmung von Affinitäten (K_d -Werten) jedoch nicht geeignet war, da kein Sättigungsplateau im verwendeten Konzentrationsbereich erreicht werden konnte.

Auf Basis dieser Experimente wurde für die Etablierung des EMSA das virale genomische Substrat nt 154-1 gewählt, da sich hier die wichtigen regulatorischen Einheiten für

Transkription und Replikation befinden und eine eindeutige Komplexbildung mittels DRaCALA detektiert werden konnte (s. Abb. 7 und Abb. 18).

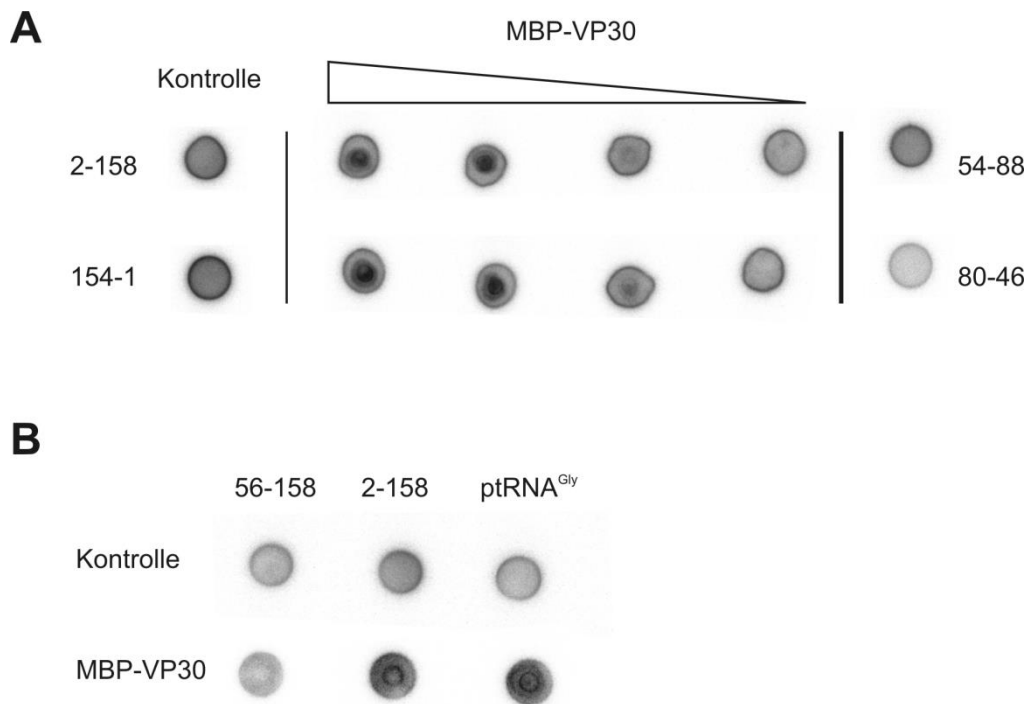


Abb. 18 Ergebnis des DRaCALA unter Verwendung verschiedener RNA-Substrate. **(A)** Die viralen RNA-Substrate 154-1 (Genom) und 2-158 (Antigenom) zeigten bei der Verwendung von MBP-VP30 eine konzentrationsabhängige RNA-Bindung (dunkler Spot im Zentrum der radioaktiven kreisförmigen Signale), während als Negativ-Kontrolle MBP verwendet wurde. Substrate, die eine Haarnadelstruktur (nt 56-78) und eine kurze einzelsträngige Extension beinhalteten (Antigenom: 54-88; Genom: 80-46), zeigten keine Interaktion. **(B)** Das antigenomische Substrat 2-158 zeigte eine Interaktion mit MBP-VP30 (vgl. (A)), während eine verkürzte Variante, die den 5'-terminalen Bereich der mRNA des ersten Gens repräsentiert (nt 56-158), keine nachweisbare Bindung aufwies. Ein nicht-virales Substrat (ptRNA^{Gly}) konnte ebenfalls gebunden werden. Als Kontrolle wurde MBP verwendet.

Das Bindungsverhalten der hier gezeigten RNA-Substrate wurde im Folgenden unter Verwendung des EMSA (s. Kap. 3.2) detailliert untersucht.

3.1.2 Etablieren der modifizierten EMSA-Variante

Zur Etablierung der EMSA-Variante wurden neben der bereits erwähnten RNA (nt 154-1) verschiedene MBP-VP30-Varianten verwendet, deren RNA-Bindungsverhalten ebenfalls mittels DRaCALA vorab evaluiert worden war. Ausgehend davon konnte angenommen werden, dass MBP-VP30 und MBP-VP30_AA das RNA-Substrat (nt 154-1) binden können, während MBP-VP30_DD keine oder nur eine schwache Bindung an RNA aufweisen sollte (s. Abb. 21; auf die verwendeten Proteinmutanten wird in Kap. 3.3 detailliert eingegangen).

Bei der Durchführung des EMSA unter Standard-TBE-Bedingungen konnten keine RNA:VP30-Komplexe im Gel nachgewiesen werden (s. Abb. 19 A links). Lediglich in den Geltaschen konnten Signale detektiert werden, die jedoch nicht das auf Basis der DRaCALA-Daten zu erwartende Bindungsverhalten der verwendeten VP30-Varianten widerspiegeln.

Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass Bestandteile des TBE-Puffers (z.B. EDTA) die Interaktion zwischen RNA und VP30 beeinträchtigen oder das Protein unter diesen Bedingungen seine native Faltung verliert und dadurch nicht mehr bindungsaktiv ist. Deshalb wurde ein sogenannter *Shift*-Puffer (sowohl für das PAA-Gel als auch als Laufpuffer) anstelle des TBE-Puffers eingesetzt, der auf Basis der Zusammensetzung des VP30-Lagerpuffers gewählt wurde (1 x *Shift*-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 200 mM NaAc; s. Abb. 19 A rechts). Die in diesem Milieu nachweisbaren RNA:VP30-Komplexe entsprachen dem erwarteten Bindungsverhalten, verblieben aber in den Probenflaschen. Außerdem zeigte die freie RNA keine einheitliche Konformation, sondern ein zweites prägnantes Signal oberhalb der Bande für die freie RNA, das vermutlich eine oligomere Form der RNA repräsentiert (z.B. Dimer).

Um das Einlaufen der RNA:VP30-Komplexe in das Gel zu erreichen, wurde eine weitaus niedrigere PAA-Prozentigkeit gewählt (5.6% PAA). Zusätzlich wurde die RNA einem Rückfaltungsprotokoll unterzogen, was ihre homogene Faltung sicherstellte (s. Abb. 19 B; Durchführung s. Kap. 2.10.2).

Darüber hinaus spielte in diesem Zusammenhang die Ionenstärke des Laufpuffers eine entscheidende Rolle, der (je nach Verdünnung) dazu beitrug, dass die Komplexe in das Gel einwandern konnten (s. Abb. 19 B links vs. rechts).

Bei Verwendung von 0.8 x *Shift*-Puffer konnten die RNA:VP30-Komplexe trotz niedriger PAA-Konzentration (5.6%) nicht in das Gel eindringen, während unter Verwendung von 0.5 x *Shift*-Puffer Komplexe im Gel nachgewiesen werden konnten. Diese waren jedoch aufgrund der sehr niedrigen PAA-Konzentration für eine Quantifizierung nicht ausreichend fokussiert (s. Abb. 19 B links). Dieses Problem konnte durch Verwendung einer Stufe in der PAA-Prozentigkeit innerhalb des Gels behoben werden, bei der die Konzentration der zweiten Stufe von 4% (ca. oberes Drittel des PAA-Gels) auf 10% erhöht wurde, was schließlich die Detektion diskreter RNA:VP30-Komplex-Signale ermöglichte (s. Abb. 23).

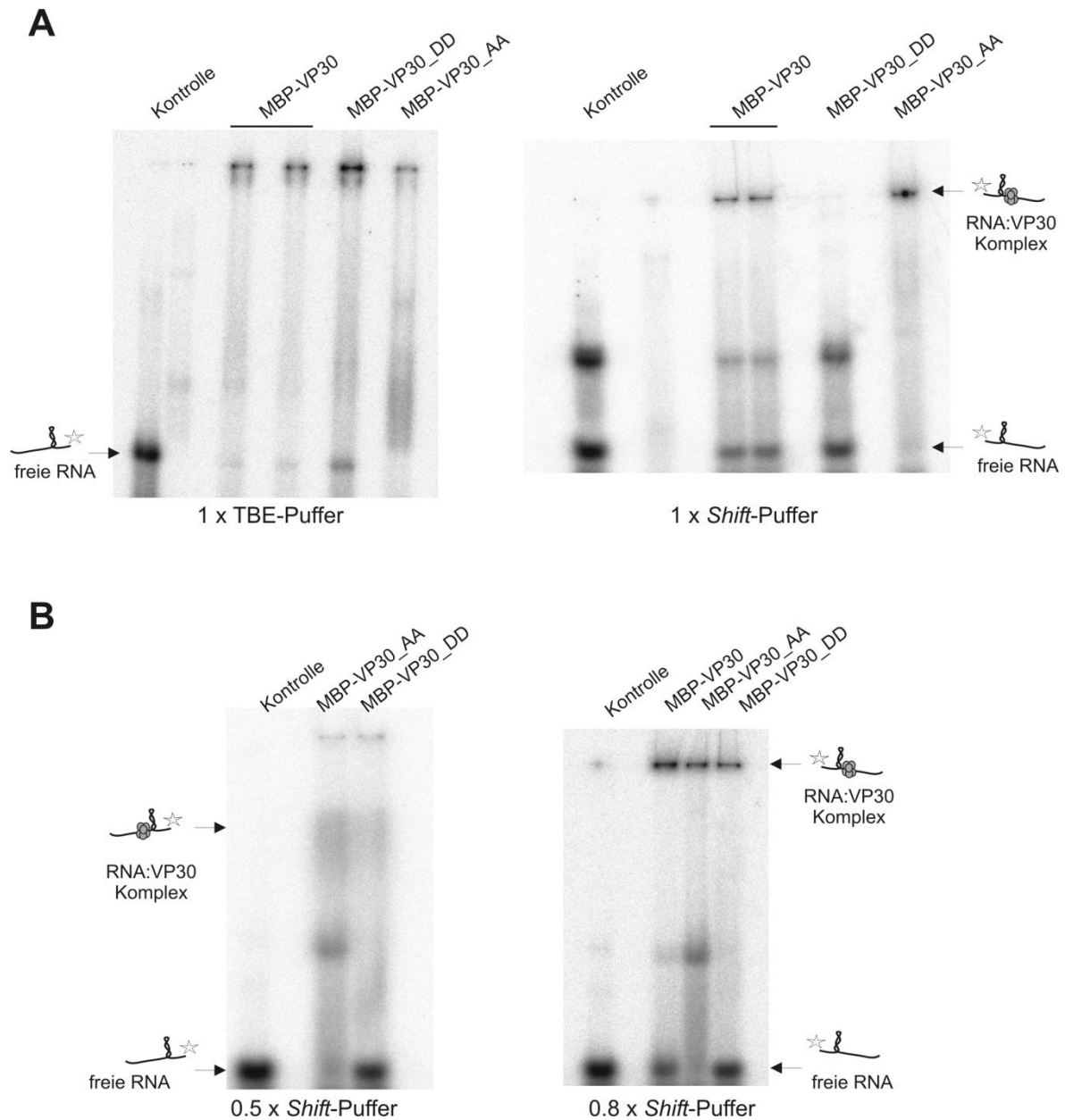


Abb. 19 Etablierung des modifizierten EMSA. **(A)** Verwendung von 1 x TBE-Puffer und 1 x *Shift*-Puffer im Vergleich (7.5% native PAA-Gele). Während unter TBE-Bedingungen keine RNA:VP30-Komplexe detektiert werden konnten (links), konnten mit Hilfe des *Shift*-Puffers RNA:VP30-Komplexe in den Geltaschen nachgewiesen werden, die dem Bindungsverhalten (laut DRaCALA) der verschiedenen VP30-Varianten entsprachen (rechts) **(B)** Verwendung verschiedener Ionenstärken im Vergleich (5.6% native PAA-Gele). Die RNA:VP30-Komplexe sind in Gegenwart von 0.8 x *Shift*-Puffer nicht in der Lage in das 5.6%ige PAA-Gel einzuwandern (rechts), während ein Einwandern in das Gel unter 0.5 x *Shift*-Pufferbedingungen stattfindet (links).

An dieser Stelle sei erwähnt, dass die Zugabe von nativem Standard-Probenpuffer (Zusammensetzung s. Tab. 11) die RNA-Bindung stark beeinträchtigte und dadurch einen negativen Effekt auf die Qualität der Bindungskurve ausübte. Deshalb und aufgrund des Glycerin-Anteils von 50% (v/v) in den verwendeten Proteinproben wurde bei der Bestimmung der K_d -Werte auf die Zugabe von Probenpuffer gänzlich verzichtet.

3.1.3 Physiologische Funktion von MBP-VP30 in Viruspartikeln

Für die Bindungsstudien wurde eine verkürzte VP30-Variante (aa 8-272) als MBP-Fusionsprotein rekombinant hergestellt. Vor der Verwendung dieser VP30-Variante stellte sich die Frage, ob MBP-VP30 sowie die verkürzte Variante von VP30 (aa 8-272; ohne MBP-tag), die beispielsweise nach der Behandlung des Fusionsproteins mittels TEV-Protease vorliegt, in der Lage sind ihre physiologische Funktion auszuüben. Aus diesem Grund wurden diese beiden Varianten im Vergleich mit VP30_{wt} (aa 1-288) in ihrer Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung analysiert (durchgeführt von Dr. Nadine Biedenkopf, AG Becker; s. Abb. 20). Man konnte deutlich erkennen, dass die Verkürzungen am N- und C-Terminus von VP30 (aa 8-272) keinen negativen Einfluss auf die Transkriptionsaktivierung im Vergleich zu VP30_{wt} (aa 1-288) ausüben. Die Fusionsprotein-Variante MBP-VP30 konnte trotz des 44 kDa großen MBP-Anteils ihre Funktion noch zu ca. 50% erfüllen (s. Abb. 20 A).

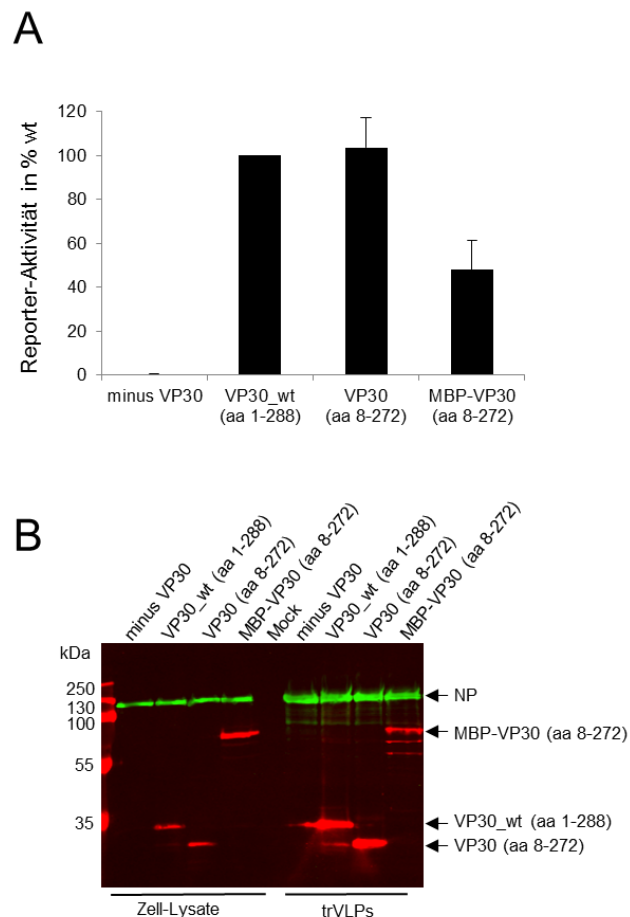


Abb. 20 Funktionalität der verwendeten VP30-Varianten. **(A)** Die Fähigkeit die Transkription zu aktivieren wurde mittels trVLPs im Vergleich zu VP30_{wt} überprüft. Die verkürzte VP30-Variante (aa 8-272) ist in ihrer Aktivität vergleichbar mit VP30_{wt}. Auch MBP-VP30 ist noch zu etwa 50% in der Lage die Transkription zu aktivieren. **(B)** Das Zelllysate und die Viruspartikel wurden mittels Western Blot auf die Anwesenheit von VP30 bzw. seiner verschiedenen Varianten überprüft (rot) [Abbildung von Dr. Nadine Biedenkopf, AG Becker].

Mit diesem Experiment wurde der Nachweis erbracht, dass die verwendeten Proteinvarianten in der Lage sind ihre transkriptionsaktivierende Funktion auszuüben. Die

Ergebnisse zeigten aber auch, dass der MBP-*tag* für die Bindungsstudien abgespalten werden sollte, da er die Fähigkeit von VP30 die Transkription zu aktivieren annähernd halbiert und damit deutlich einschränkt.

Ein weiterer funktioneller Nachweis bestand darin, die Viruspartikel auf die Anwesenheit der verschiedenen VP30-Varianten hin zu prüfen. Mittels Western Blot konnte gezeigt werden, dass alle verwendeten VP30-Konstrukte in Viruspartikel eingebaut werden (s. Abb. 20 B).

3.1.4 RNA-Bindungsverhalten von MBP-VP30 vor und nach Behandlung mit TEV-Protease

Bereits im vorherigen Kapitel deutete sich bei der Untersuchung der Fähigkeit der Transkriptionsaktivierung an, dass VP30 ohne den MBP-Anteil der physiologischen Situation des Wildtyp-Proteins am nächsten kommt (s. 3.1.3; Abb. 20 A).

Das Bindungsverhalten von MBP-VP30 und der Einfluss einer vorherigen TEV-Spaltung wurden mittels DRaCALA und EMSA analysiert. Hierbei konnte im DRaCALA beobachtet werden, dass der MBP-Anteil das Bindungsverhalten von VP30 (negativ) beeinflusst. Dies konnte anhand der RNA nt 56-158 (Antigenom) und der Variante VP30_DD gezeigt werden, die nur mit TEV-behandelten Proteinproben RNA:VP30-Komplexe ausbildeten (s. Abb. 21 A). Eine vergleichbare Beobachtung wurde auch bei Verwendung des EMSA gemacht (s. Abb. 21 B). Ein zusätzlicher positiver Effekt, den die TEV-Spaltung auf die Detektion der RNA:VP30-Komplexe ausübte, war eine erhöhte Gelmobilität der Komplexe im Vergleich zu den unbehandelten Proben, was möglicherweise auf das stark verringerte Molekulargewicht des TEV-behandelten VP30 zurückzuführen ist (s. Abb. 21 B).

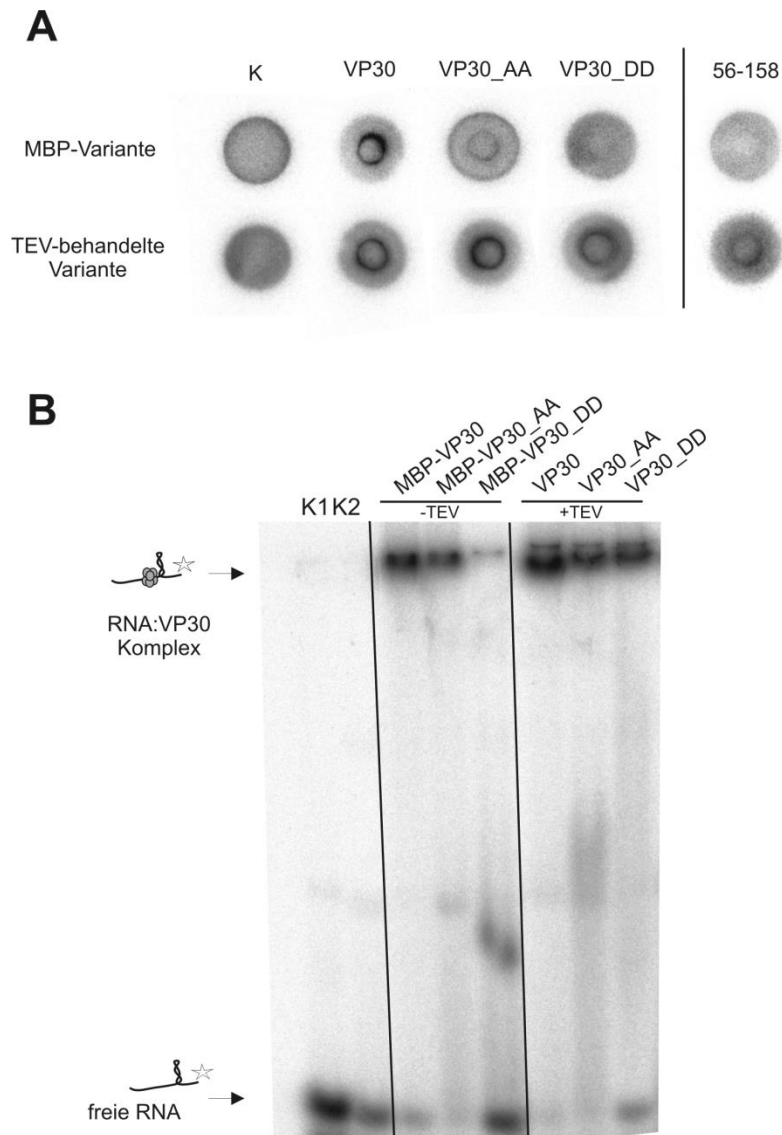


Abb. 21 RNA-Bindungsverhalten von VP30 mit und ohne TEV-Behandlung. **(A)** Mittels DRaCALA wurden verschiedene Proteinvarianten und RNAs miteinander verglichen. Ein signifikanter Unterschied wurde v.a. bei der Proteinvariante VP30_DD und der antigenomischen RNA 56-158 festgestellt, die nur nach vorheriger TEV-Behandlung eine eindeutige Bindung zeigten; auch bei der VP30-Variante VP30_AA lässt sich eine Verbesserung der RNA-Bindung anhand der Signalstärke vermuten. **(B)** Mittels EMSA (5.6% natives PAA-Gel) konnten die Ergebnisse aus (A) bestätigt werden; während unbehandeltes MBP-VP30_DD keine RNA:VP30-Komplexe ausbildete, so war eine deutliche Komplexbildung im Fall der TEV-behandelten VP30_DD-Probe erkennbar; K1 = Kontrolle, in der kein Protein hinzugefügt wurde, K2 = Kontrolle, in der anstelle von VP30 oder MBP-VP30 nur MBP hinzugefügt wurde.

Aus den oben angeführten Gründen wurden die verschiedenen MBP-VP30-Varianten vor den Bindungsstudien stets mittels TEV-Protease behandelt.

3.1.5 RNA-Bindungsverhalten von VP30 nach unterschiedlicher Proteinaufreinigung

Nach der nativen Präparation von MBP-VP30 wurde anhand eines UV-Spektrums ein 260 nm/280 nm-Quotient von etwa 1.3 bestimmt, der einer Verunreinigung durch z.B. unspezifisch gebundene (zelluläre) Nukleinsäuren von etwa 10% entsprach.

Um auszuschließen, dass bei den durchgeführten Bindungsstudien die Affinität durch diese Verunreinigungen negativ beeinflusst wird, wurde ein denaturierendes Aufreinigungsprotokoll für MBP-VP30 etabliert (s. Kap. 2.8.1). Nach der denaturierenden Aufreinigung über anschließende Rückfaltung wies das Proteinspektrum einen 260 nm/280 nm-Quotient von 0.8 auf (Verunreinigung ca. 2%) und zeigte damit eine deutliche Steigerung in der Reinheit im Vergleich zur nativen Aufreinigung.

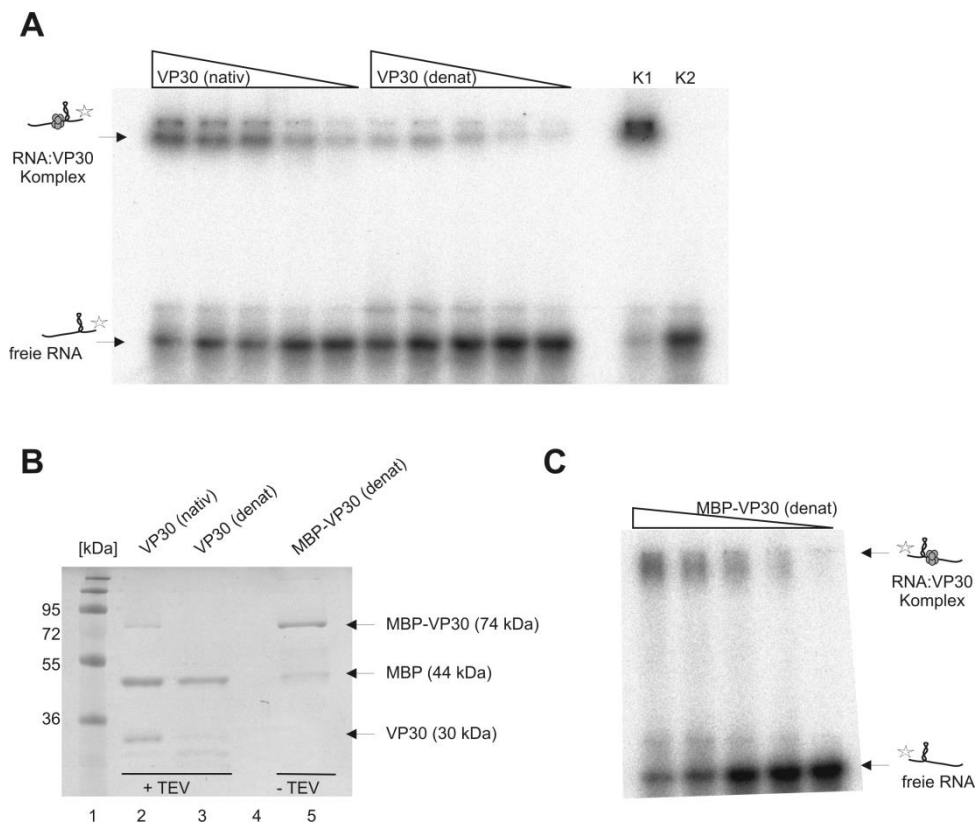


Abb. 22 Vergleich zwischen nativer und denaturierender VP30-Präparation. **(A)** Für die vergleichende RNA-Bindungsuntersuchung wurden beide Proteinpräparationen mit TEV-Protease behandelt und auf gleiche Konzentrationen eingestellt. Anhand des EMSA (4%-10% natives Stufen-PAA-Gel) konnte eine deutliche Verschlechterung des Bindungsverhaltens der denaturierenden im Vergleich zur nativen Präparation festgestellt werden (K1 = Positiv-Kontrolle mit maximaler VP30-Konzentration; K2 = Negativ-Kontrolle mit MBP). **(B)** SDS-PAGE (15%) mit dem denaturierend aufgereinigten MBP-VP30 vor (Spur 5) und nach (Spur 3) Behandlung mit TEV-Protease sowie die native Präparation nach TEV-Behandlung (Spur 2). Bei der denaturierenden VP30-Präparation ist das VP30 nach TEV-Spaltung im Gel kaum mehr nachweisbar. **(C)** EMSA (4%-10% natives Stufen-PAA-Gel) der Fusionsprotein-Variante nach denaturierender Aufreinigung. Die unbehandelte VP30-Variante zeigte unter diesen Bedingungen eine starke Bindungskompetenz, was den Erfolg der denaturierenden Aufreinigung bestätigte.

Das Bindungsverhalten der beiden VP30-Präparationen wurde vergleichend analysiert (s. Abb. 22). Beide Ansätze wurden vor den Bindungsstudien mit TEV behandelt und in gleichen Konzentrationen eingesetzt. Man kann deutlich erkennen, dass das denaturierend aufgereinigte VP30 stark an Bindungsaktivität verliert (s. Abb. 22 A). Der Grund hierfür lag vermutlich in der geringen Stabilität von VP30 in dieser Proteinpräparation, das nach TEV-Spaltung kaum im SDS-Gel nachgewiesen werden konnte und somit vermutlich degradiert war (s. Abb. 22 B Spur 3).

Die Analyse der RNA-Bindung des Fusionsproteins zeigte jedoch, dass auch das denaturierend aufgereinigte VP30 in der Lage ist RNA effizient zu binden (s. Abb. 22 C).

Durch die denaturierende Aufreinigung von VP30 konnte der Reinheitsgrad der Proteinprobe deutlich erhöht werden. Der Erfolg der Rückfaltung wurde durch die RNA-Bindungsaktivität bestätigt. Allerdings konnte diese Variante aufgrund mangelnder Stabilität keiner Behandlung mit der TEV-Protease unterzogen werden und auch die Ausbeute der Präparation gegenüber der nativen Aufreinigung fiel weitaus geringer aus (ca. 1/10). Die Verwendung des Fusionsproteins zeigte zudem keine signifikante Verbesserung der RNA-Bindungsfähigkeit gegenüber dem nativ gereinigten MBP-VP30, so dass für die Bindungsstudien die native VP30-Präparation gewählt wurde.

3.1.6 Zusammenfassung

Eine Grundvoraussetzung für die Bindungsstudien, die im Rahmen dieses Projektes durchgeführt werden sollten, war die Etablierung einer Methode über die die Affinitäten von VP30 (inkl. seiner verschiedenen Varianten) zu diversen Substraten bestimmt werden konnten.

Hierbei war zum einen wichtig, dass RNA:VP30-Komplexe generell visualisiert und detektiert werden konnten, dass die Bindungskurve bis zu einem Sättigungsplateau vermessen und dass zwischen verschiedenen Komplexpopulationen unterschieden werden konnte, da VP30 bekanntermaßen neben Hexameren auch höhermolekulare Oligomere ausbilden kann [90].

Die hier vorgestellte Variante des EMSA erfüllte die genannten Bedingungen und konnte für die Quantifizierung der Komplexe sowie die Bestimmung apparenter K_d -Werte (Dissoziationskonstanten) verwendet werden (s. Abb. 23).

Für die Quantifizierung wurden die freie RNA sowie die beiden Komplexpopulationen C_1 und C_{HMW} berücksichtigt. Letztere trat verstärkt bei der Verwendung bestimmter VP30-Mutanten auf (s. Kap. 3.3). Nach Abzug des Hintergrundes und der Kontrolle (K) wurden sowohl der Anteil von C_1 als auch C_{HMW} kalkuliert, wobei die Bestimmung der apparenten K_d -Werte stets auf Basis von C_1 durchgeführt wurde. Da in *Gelshift*-Assays keine echten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten bestimmt werden können, handelt es sich bei den ermittelten Werten um apparente K_d -Werte, die jedoch im Folgenden vereinfacht als K_d -Werte bezeichnet werden.

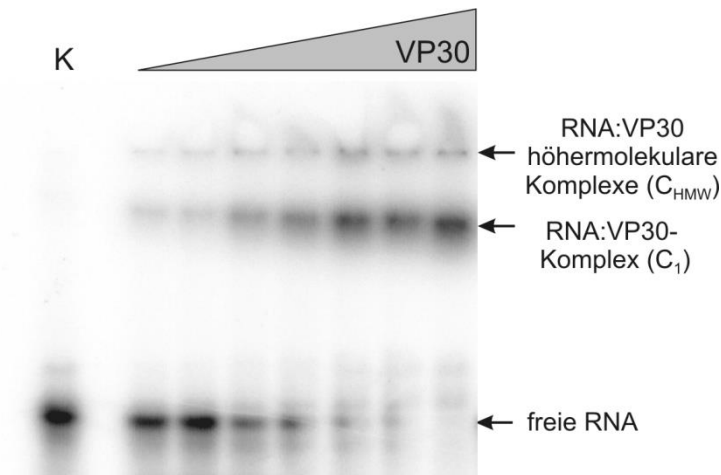


Abb. 23 Exemplarischer EMSA zur spezifischen Darstellung von RNA:VP30-Komplexen. Die freie RNA konnte von zwei verschiedenen Komplexpopulationen getrennt werden. Der Komplex C_1 entspricht den Komplexen, die ins Gel einlaufen, während C_{HMW} die Population der höhermolekularen Komplexe in den Geltaschen repräsentiert (4%-10% natives Stufen-PAA-Gel). Bei der Quantifizierung wurden beide Komplexformationen berücksichtigt. K = Kontrolle unter Verwendung von TEV-behandeltem MBP; $[RNA] \ll [Protein]$.

Als Bindungsmodell wurde (wenn nicht explizit anders erwähnt) eine einzelne Bindungsstelle angenommen (*one-ligand-bindingsite model*) und der K_d -Wert nach der Formel $[RNA:VP30 - Komplex] = \frac{capacity * [VP30]}{K_d + [VP30]}$ mit dem Kurvenanpassungsprogramm GraFit (Version 5.0.13; Erithacus Software) bestimmt.

Die hier vorgestellte modifizierte Variante des EMSA konnte auch für Bindungsexperimente mit anderen viralen Proteinen erfolgreich verwendet werden (z.B. VP35; N (RVFV); Daten hier nicht gezeigt) und stellt somit eine vielversprechende methodische Variante dar, um RNA:Protein-Komplexe mittels EMSA zu untersuchen, die unter Standardbedingungen nicht detektierbar sind.

3.2 *In vitro* Charakterisierung der RNA-Bindungsaktivität von VP30

Ein wichtiger Schritt auf dem Weg zum Verständnis des physiologischen Kontextes der RNA-Bindung von VP30 bestand darin zu evaluieren, welche Anforderungen eine RNA für die Bindung an VP30 erfüllen muss. Im Folgenden wurden die Bindungspräferenzen und Substratanforderungen von VP30 unter Verwendung verschiedener viraler sowie nicht-viraler Substrate untersucht und eine mögliche Bindungsregion identifiziert.

3.2.1 Strukturelle Untersuchung der viralen RNA-Substrate

Vor der Durchführung der eigentlichen *in vitro* Bindungsstudien wurden die potenziellen Sekundärstrukturen der gewählten viralen Ausgangssubstrate (auf genomischer (nt 154-1) sowie antigenomischer (nt 2-158) Ebene) bioinformatisch sowie experimentell analysiert.

3.2.1.1 Bioinformatische Strukturvorhersagen

Die RNA-Strukturvorhersage wurde mittels `RNAfold` durchgeführt (s. Kap. 2.11.4) und ergab, dass innerhalb der ersten 154 Nukleotide auf Genomebene drei Sekundärstrukturen zu erwarten sind. Diese umfassen die (I) Nukleotide (nt) 45-4, (II) 78-56 und (III) 154-120. Anhand des Temperaturprofils und einer ΔG -Kalkulation (kalkuliert mit `mfold`; s. Kap. 2.11.5) konnte die Stabilität der drei Strukturen genauer beurteilt werden (s. Abb. 24). Hierbei stellte sich die dritte Struktur (nt 154-120) mit einem ΔG -Wert von -6.0 kcal/mol und einer vorhergesagten Schmelztemperatur zwischen 60 °C und 70 °C als die wahrscheinlich instabilste heraus. Für die anderen beiden potenziellen Strukturen wurden unter Standardbedingungen ΔG -Werte von -12.90 kcal/mol (nt 45-4) und -7.10 kcal/mol (nt 78-56) und Schmelztemperaturen zwischen 80 °C und 90 °C vorhergesagt.

Eine analoge bioinformatische Strukturvorhersage wurde für das antigenomische Substrat durchgeführt (nt 2-158; s. Abb. 25). Hierbei ergaben sich bei 37 °C vier potenzielle Strukturen: (I) nt 5-44, (II) 56-78 (III) 85-102 und (IV) 131-148 (ΔG -Werte nach `mfold`: (I) -8.30 kcal/mol, (II) -10.00 kcal/mol, (III) -0.90 kcal/mol und (IV) -5.30 kcal/mol).

Äquivalente Strukturen zu den Strukturelementen (I), (II) und (IV) sind auch im genomischen Substrat an einer ähnlichen Position zu finden.

In einer temperaturabhängigen Strukturvorhersage schmolz Struktur (III), die auch nach Kalkulation des ΔG -Wertes die mit Abstand instabilste zu sein scheint, direkt bei der ersten Temperaturerhöhung von 37 °C auf 50 °C. Die Strukturen (I) und (IV) verschwanden zwischen 70 °C und 80 °C. Für die zweite Haarnadelstruktur wurde wie auch im Fall des

genomischen Substrates noch bei 90 °C eine zumindest transiente Ausbildung der Basenpaarung vorhergesagt (s. Abb. 25).

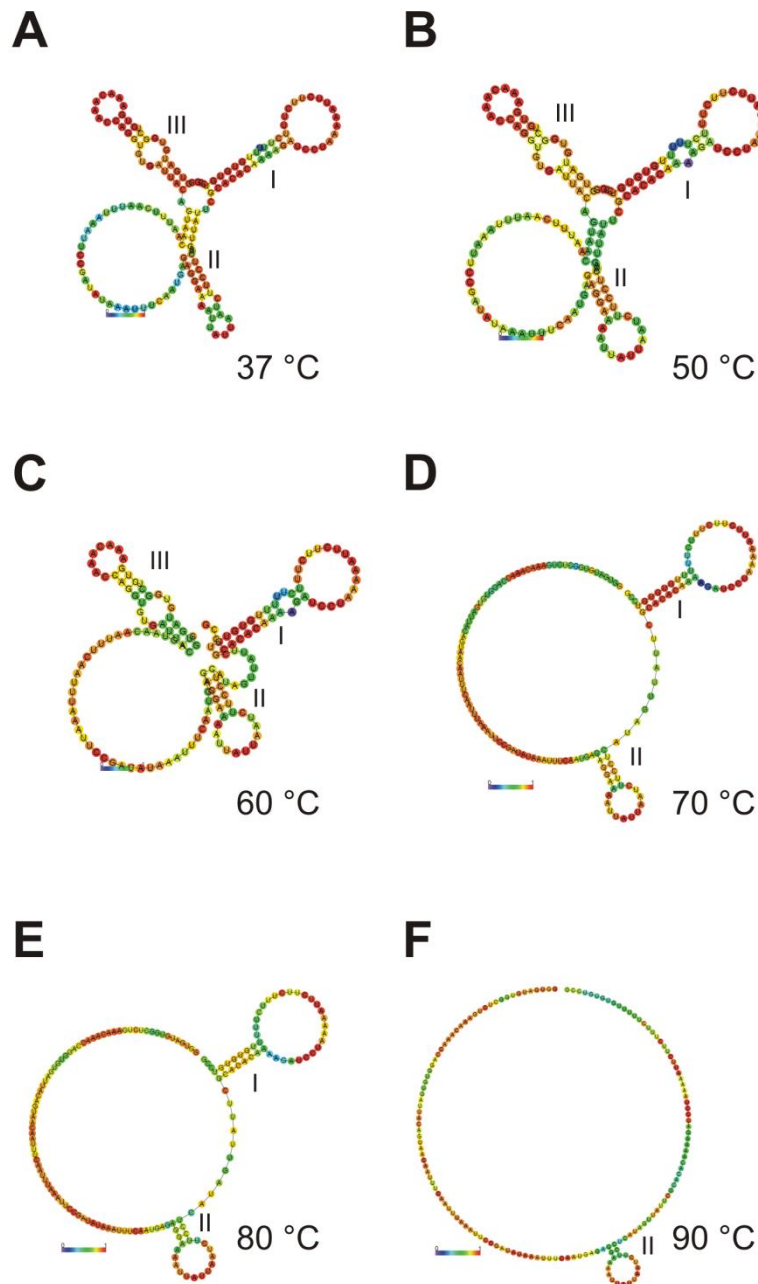


Abb. 24 Die Strukturvorhersage (*Centroid*-Struktur) des genomischen Substrates (nt 154-1) im Temperaturverlauf mittels *RNAfold*. (A) Die *Centroid*-Struktur bei 37 °C zeigt drei potenzielle Sekundärstrukturen bei (I) nt 45-4, (II) nt 78-56 und (III) nt 154-120. (B) Die *Centroid*-Struktur bei 50 °C sagt im Vergleich zu 37 °C keine wesentlichen Veränderungen vorher. (C) Die *Centroid*-Struktur bei 60 °C beinhaltet die drei genannten Strukturen, einige Basenpaarungen im Zentrum sind jedoch aufgelöst. (D) Bei der *Centroid*-Struktur bei 70 °C ist die dritte Sekundärstruktur aufgeschmolzen. (E) Die *Centroid*-Struktur bei 80 °C zeigt eine vergleichbare Vorhersage wie (D). (F) Bei 90 °C sind alle Strukturen aufgeschmolzen, lediglich ein kurzer basengepaarter Bereich der zweiten Haarnadelstruktur ist noch erkennbar. Der Farbcode in dieser Abbildung spiegelt die Wahrscheinlichkeit des jeweiligen Nukleotids in dem gezeigten Zustand wider (blau = unwahrscheinlich; rot = wahrscheinlich).

Die potenzielle Strukturbildung des antigenomischen Substrates (nt 2-158) ist erwartungsgemäß der des genomischen Substrates (nt 154-1) sehr ähnlich. Zu bemerken ist jedoch, dass die äquivalenten Strukturelemente unterschiedliche Stabilitäten besitzen. So

scheint z.B. Struktur (I) auf dem genomischen Substrat im Vergleich zu seinem antigenomischen Pendant stabiler zu sein. In beiden Fällen wird die wichtige Haarnadelstruktur an den Positionen 56-78 bis hin zu sehr hohen Temperaturen ausgebildet, wobei laut ΔG -Kalkulation die Haarnadelstruktur auf dem Antigenom als etwas stabiler vorhergesagt wird.

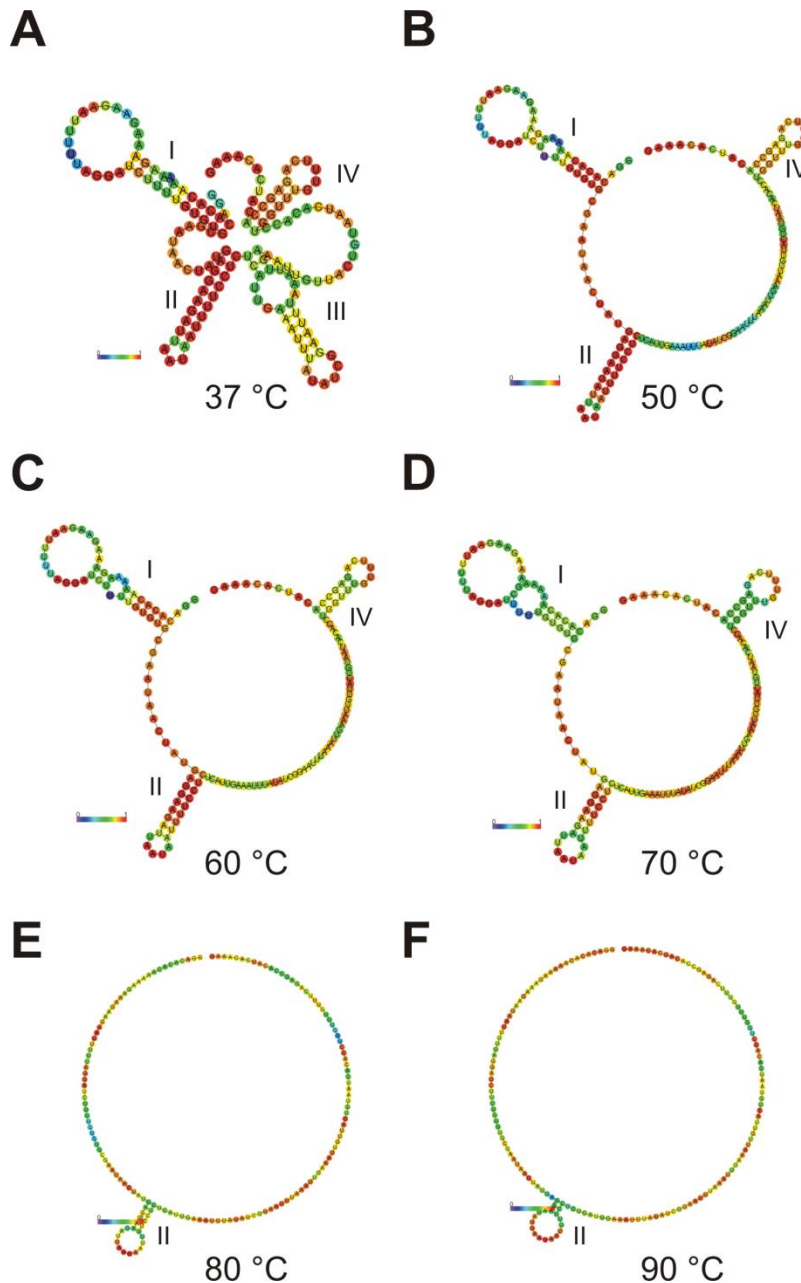


Abb. 25 Die Strukturvorhersage (*Centroid*-Struktur) des antigenomischen Substrates (nt 2-158) im Temperaturverlauf mittels *RNAfold*. **(A)** Die *Centroid*-Struktur bei 37 °C zeigt vier potenzielle Sekundärstrukturen (I) nt 5-44, (II) nt 56-78, (III) nt 85-102 und (IV) 131-148. **(B)** Bei 50 °C ist Strukturelement (III) bereits aufgeschmolzen, für 60 °C **(C)** und 70 °C **(D)** ist die Vorhersage sehr ähnlich. **(E)** Die *Centroid*-Struktur bei 80 °C zeigt die größte Veränderung, da sowohl Struktur (I) als auch (III) komplett aufgeschmolzen sind. **(F)** Bei 90 °C sind alle Nukleotide im einzelsträngigen Zustand, lediglich ein kleiner Rest der zweiten Haarnadelstruktur ist erkennbar. Der Farbcode in dieser Abbildung spiegelt die Wahrscheinlichkeit des jeweiligen Nukleotids in dem gezeigten Zustand wider (blau = unwahrscheinlich; rot = wahrscheinlich).

3.2.1.2 Experimentelle Strukturanalyse

Um die Strukturen der Ausgangssubstrate auch experimentell zu verifizieren, wurden die beiden RNAs (nt 154-1 und nt 2-158) einer Strukturanalyse basierend auf der Behandlung der RNAs mit chemischen und enzymatischen Sonden unterzogen. Dabei wurden Pb^{2+} -Ionen verwendet, die spezifisch einzelsträngige und leicht zugängliche Regionen spalten. Zusätzlich wurde RNase T1 verwendet, die spezifisch nach ungepaarten Guanosinen spaltet. RNase T1 kann sowohl nativ als auch unter denaturierenden Bedingungen verwendet werden. In Kombination mit einer alkalischen Leiter (generiert Spaltprodukte nach jedem Nukleotid) kann die denaturierende T1-Leiter für die Zuordnung der Spaltfragmente verwendet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Struktur der genomischen RNA (Nukleotide 154-1) experimentell ermittelt (s. Abb. 26). Beginnend am 3'-Ende konnte eine flexible Region zwischen zwei geschützten Bereichen durch Pb^{2+} -Spaltung identifiziert werden (s. Abb. 26 A und B; flexible Region in orange markiert), die der ersten Haarnadelstruktur von nt 45-4 in Übereinstimmung mit der Strukturvorhersage (Strukturelement I in Abb. 24) entspricht. Daran schloss sich eine kurze einzelsträngige Region an (nt 55-46; hervorgehoben in blau). Die zweite Haarnadelstruktur (nt 78-56) konnte ebenfalls identifiziert werden und zeigte in den Stammregionen keinerlei Zugänglichkeit für Pb^{2+} -Ionen oder RNase T1 (nativ) (vgl. Strukturelement II in Abb. 24). Unter denaturierenden Bedingungen konnte hier eine leichte Zugänglichkeit der drei Guanosine in der Stammregion (nt 75/76/78) detektiert werden, sowie eine sehr kurze flexible Region (siehe Bleispaltung) im Schleifenbereich der Haarnadel. Auf diese sehr stabile Struktur folgte ein durchgehend einzelsträngiger Bereich, der anhand der Spaltprodukte der Pb^{2+} -Ionen und der RNase T1 bis zum Nukleotid 150 festgelegt werden konnte (s. Abb. 26 B-D). Damit konnte die dritte vorhergesagte Struktur experimentell nicht bestätigt werden.

In Abb. 26 E ist die experimentell ermittelte Struktur der RNA zu sehen. Die Produkte der Spaltung durch Pb^{2+} -Ionen (markiert durch Kreise) sowie durch RNase T1 (markiert durch Dreiecke; offene für native Spaltung, geschlossene für denaturierende Spaltung) sind entsprechend ihrer Intensität größenvariiert dargestellt.

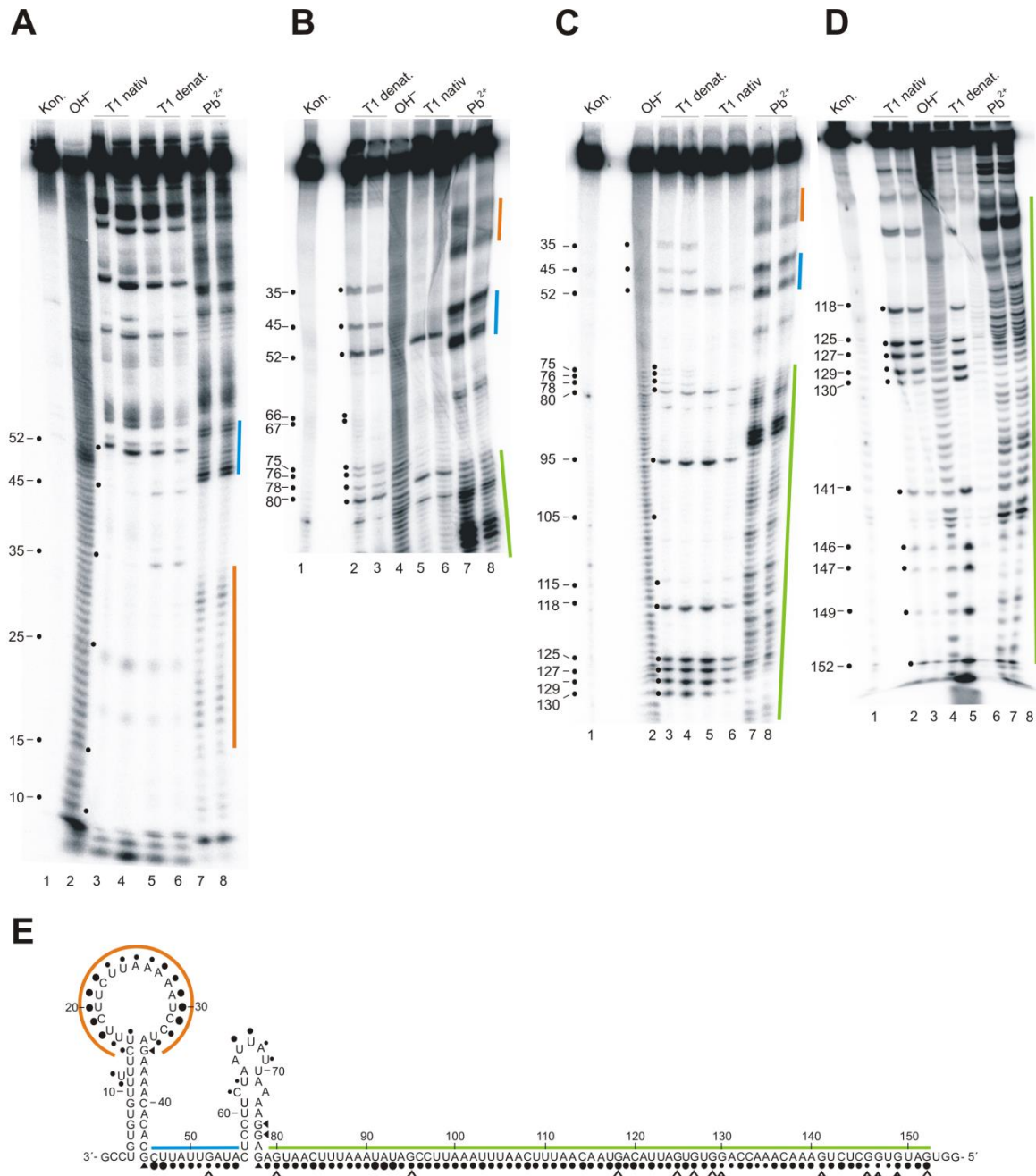


Abb. 26 Ergebnis der experimentellen Strukturanalyse des genomischen Substrates 154-1. **(A)** und **(B)** Anhand der Pb²⁺- und der RNase T1-Spaltprodukte konnte eine flexible Region am 3'-Ende (orange) identifiziert werden, die flankiert ist von geschützten Bereichen. Dies entspricht der ersten vorhergesagten Sekundärstruktur, die die Nukleotide 45-4 umfasst; nach einem kurzen einzelsträngigen Bereich (blau) konnte die zweite stabile Struktur identifiziert werden (nt 78-56), für die nur eine geringe Zugänglichkeit im Schleifenbereich beobachtet wurde. **(B)**-(**D**) Der anschließende Bereich wurde als unstrukturiert nachgewiesen (grün). **(E)** Experimentell ermittelte Struktur der RNA, wobei der Farbcode der Markierung in **(A)**-(**D**) entspricht. Zusätzlich sind die durch Pb²⁺-Ionen und RNase T1 erhaltenen Spaltstellen nach ihrer Intensität mit einem größenvariablen Kreis (Pb²⁺) oder Dreieck (RNase T1; offen für native Spaltung, gefüllt für denaturierende Spaltung) dargestellt.

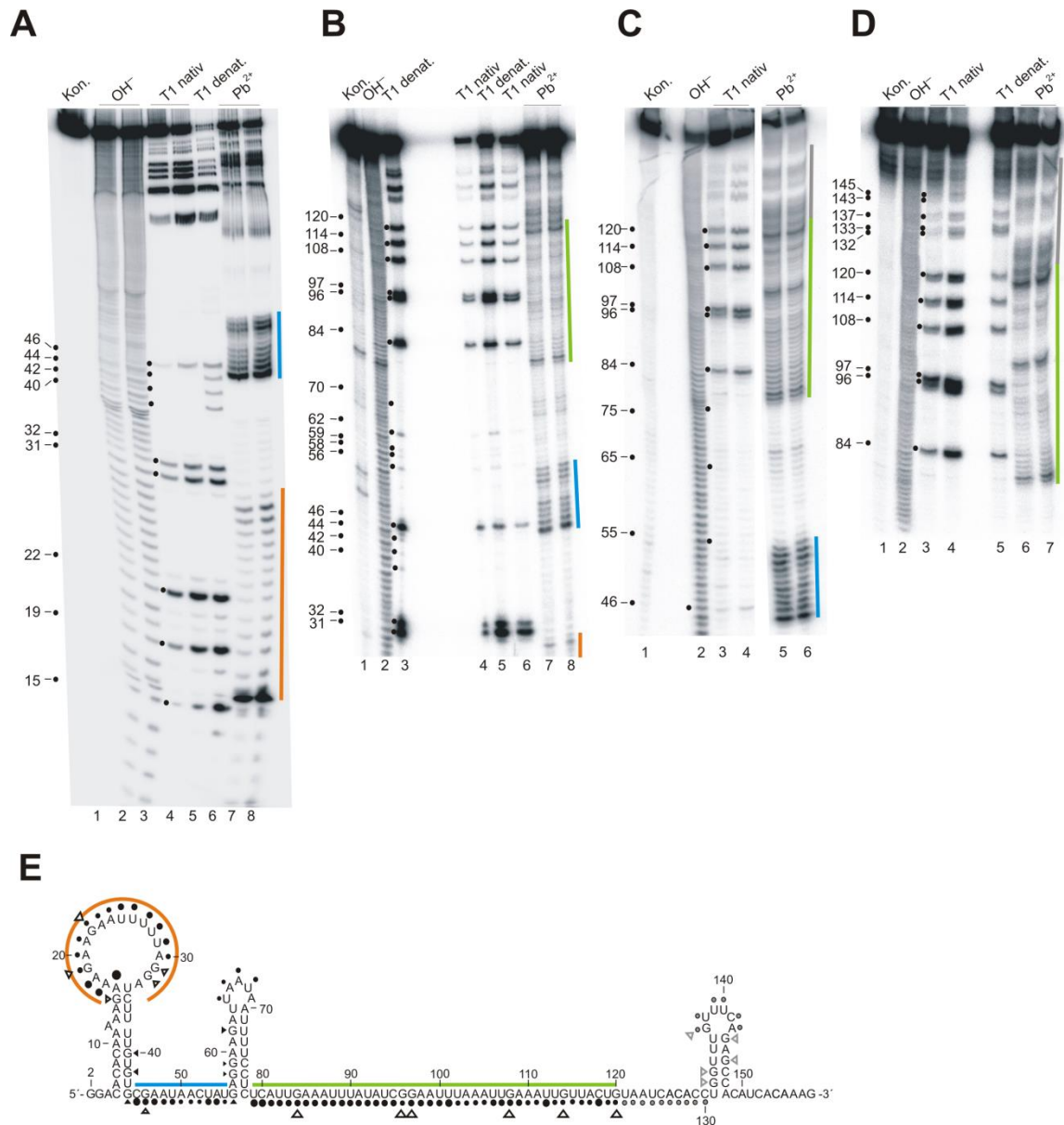


Abb. 27 Ergebnis der experimentellen Strukturanalyse des antigenomischen Substrates 2-158. **(A)** und **(B)** Anhand der Pb²⁺- und der RNase T1-Spaltprodukte konnte eine flexible Region am 5'-Ende (orange) identifiziert werden, die flankiert ist von geschützten Bereichen. Dies entspricht der ersten Sekundärstruktur, die die Nukleotide 5-44 umfasst; nach einem kurzen einzelsträngigen Bereich (blau) konnte die zweite sehr stabile Struktur identifiziert werden (nt 56-78), für die auch im Schleifenbereich nur eine geringe Pb²⁺-Ionen-Zugänglichkeit beobachtet wurde. **(B)**-**(D)** Der anschließende Bereich wurde als unstrukturiert nachgewiesen (grün). Der 3'-terminale Bereich konnte nur bedingt aufgelöst werden (grau), lieferte aber Hinweise auf eine dritte Sekundärstruktur von nt 131-148. **(E)** Experimentell ermittelte Struktur der RNA, wobei der Farbcode der Markierung an den Gelen entspricht. Zusätzlich sind die durch Pb²⁺-Ionen und RNase T1 erhaltenen Spaltstellen nach ihrer Intensität mit größenvariieren Kreisen (Pb²⁺) oder Dreiecken (RNase T1; offen für native Spaltung, gefüllt für denaturierende Spaltung) dargestellt.

Die experimentelle Strukturanalyse des antigenomischen Substrates (nt 2-158) konnte bis ca. Nukleotid 120 aufgelöst werden, wobei die Strukturelemente (I) und (II) analog zum genomischen Substrat bestätigt werden konnten (s. Abb. 27). Das eher instabile Strukturelement (III) konnte experimentell nicht nachgewiesen werden. Im Fall des Strukturelements (IV) gab es Hinweise auf seine Ausbildung, die jedoch nicht nukleotidgenau aufgelöst werden konnte.

Zusammenfassend ergaben die Strukturanalysen, dass das genomische und antigenomische Ausgangssubstrat äquivalente Strukturelemente (v.a. (I) und (II)) ausbildet und somit bei den *in vitro* Bindungsstudien von einer ähnlichen Faltung, allerdings mit umgekehrter Polarität, ausgegangen werden konnte.

3.2.2 Untersuchung der RNA:VP30-Bindung anhand viraler RNA-Substrate

Auf Basis der vorangegangenen Strukturanalysen wurden Bindungsstudien mit VP30 und verschiedenen viralen Substraten durchgeführt. Die dabei erhaltenen Ergebnisse werden im Folgenden vorgestellt.

3.2.2.1 Deletionsanalysen genomischer und antigenomischer RNA-Substrate

Zur Charakterisierung der RNA-Bindung von VP30 wurde zunächst für das genomische Substrat (nt 154-1) eine Deletionsanalyse durchgeführt (s. Abb. 28). Hierbei wurde das Ausgangssubstrat sowohl vom 5'- als auch vom 3'-Ende her auf Basis der ermittelten Strukturelemente deletiert, um so mögliche Bindungsstellen von VP30 zu identifizieren. Wie bereits bei der Strukturanalyse gezeigt, ist das 3'-Ende stark strukturiert, während zum 5'-Ende hin ein ausgedehnter einzelsträngiger Bereich vorliegt (s. Abb. 26). Bei einer Verkürzung des 5'-terminalen einzelsträngigen Bereiches um ca. 40 nt (Substrat 118-1) wurde eine Abnahme der Affinität um ca. Faktor 3 beobachtet. Weitere Deletionen dieses Bereiches führten zu einer moderaten zusätzlichen Reduktion der Affinität (Substrat 80-1). Zudem wurde der Anteil der bindungskompetenten RNA stark beeinträchtigt, was sich durch die Abnahme des Bindungsplateaus bemerkbar machte (s. Abb. 28 A). Dies deutete darauf hin, dass die einzelsträngige Region maßgeblich an der RNA-Bindung beteiligt ist. Die noch zu einem maximalen Anteil von 30% detektierbare Bindung von VP30 zum Substrat 80-1 könnte so interpretiert werden, dass diese stark strukturierte RNA zu etwa einem Drittel in einer bindungskompetenten Konformation, z.B. durch ein zeitweises Aufschmelzen der Sekundärstrukturen, vorliegen kann und in dieser Form als RNA:VP30-Komplex im Gel detektierbar war.

Bei Deletionen vom 3'-Ende her konnte man erkennen, dass die Entfernung der ersten Sekundärstruktur (nt 45-4; Substrat: 154-55) keine Auswirkung auf die Affinität von VP30 hat, was bestätigte, dass doppelsträngige/strukturierte Bereiche wenig Einfluss auf die RNA-Bindung haben. Interessanterweise wurde jedoch eine ca. 2.5-fache Abnahme der Affinität beobachtet, wenn auch die zweite Sekundärstruktur (nt 78-56) deletiert wurde, die entweder auf genomischer oder antigenomischer Ebene für die VP30-Abhängigkeit der Transkription verantwortlich ist [94]. Eine weitere Deletion (154-112) führte zu keiner substanziellen zusätzlichen Reduktion der Affinität, hatte jedoch starken Einfluss auf das Bindungsplateau.

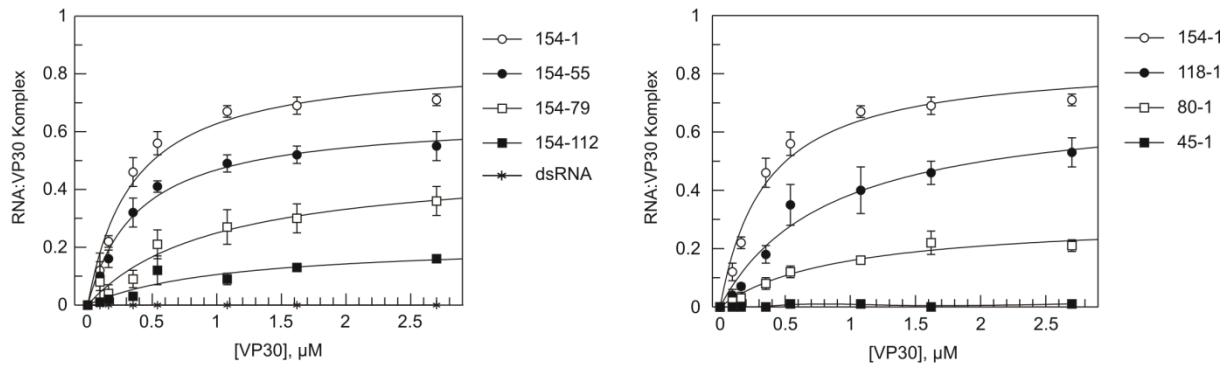
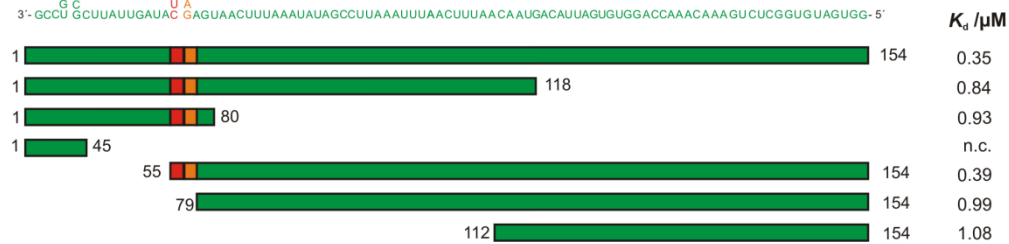
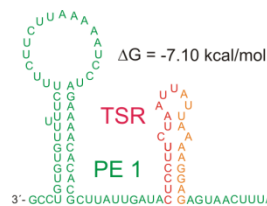
A**B** $\Delta G = -12.90 \text{ kcal/mol}$ 

Abb. 28 Ergebnisse der Deletionsanalyse auf Genomebene. **(A)** Bindungskurven der verschiedenen RNA-Varianten. Links: die Deletionsanalyse aus 3'-Richtung zeigte ein stark unterschiedliches Bindungsverhalten der RNA-Varianten, das sich vor allem in den herabgesetzten Endpunkten bemerkbar machte (Affinitäten siehe (B)). Als Negativ-Kontrolle wurde eine doppelsträngige RNA (dsRNA) verwendet, die aus einem Hybrid des genomischen und antigenomischen Substrates bestand (ca.150 bp; Hybrid aus 154-1 und 2-158); rechts: analoge Deletionsanalyse von der 5'-Seite, wobei auch hier eine starke Abnahme der Bindungsplateaus beobachtet werden konnte. **(B)** Die RNA-Sequenz zeigt das Ausgangssubstrat mit den zwei experimentell bestätigten Sekundärstrukturen einschließlich ihrer Stabilität. Die Bezeichnungen PE1 (= Promotorelement 1), TSR (= Transkriptionsstartregion) und PE2/5'-UTR NP (= Promotorelement 2 und 5'-UTR der NP mRNA) wurden aus der in Abb. 7 gezeigten Annotation abgeleitet. Die verwendeten Konstrukte sind schematisch dargestellt. Deletionen vom unstrukturierten 5'-Ende her führen zu einer ca. 3-fachen Reduktion der Affinität (zu erkennen am K_d -Wert-Unterschied zwischen 154-1 und 118-1). Eine weitere Verkürzung der 5'-Region (80-1) führte zu einer geringfügigen zusätzlichen Verschlechterung der Affinität, während für die RNA 45-1 keine Komplexbildung mehr beobachtet werden konnte; die Deletionsanalyse vom 3'-Ende her bestätigte, dass die strukturierte Region am 3'-terminalen Ende nicht zur Affinität beitrug (154-55), während die Deletion der zweiten Sekundärstruktur einen ca. 3-fachen Affinitätsverlust bewirkte (n.c. = *no complex*, keine RNA:VP30-Komplexe detektierbar).

Beide Deletionsreihen des genomischen Ausgangssubstrates 154-1 zeigten einen bemerkenswerten Effekt auf das Bindungsplateau der RNA-Substrate, das sich mit jeder Deletion sukzessive verringerte.

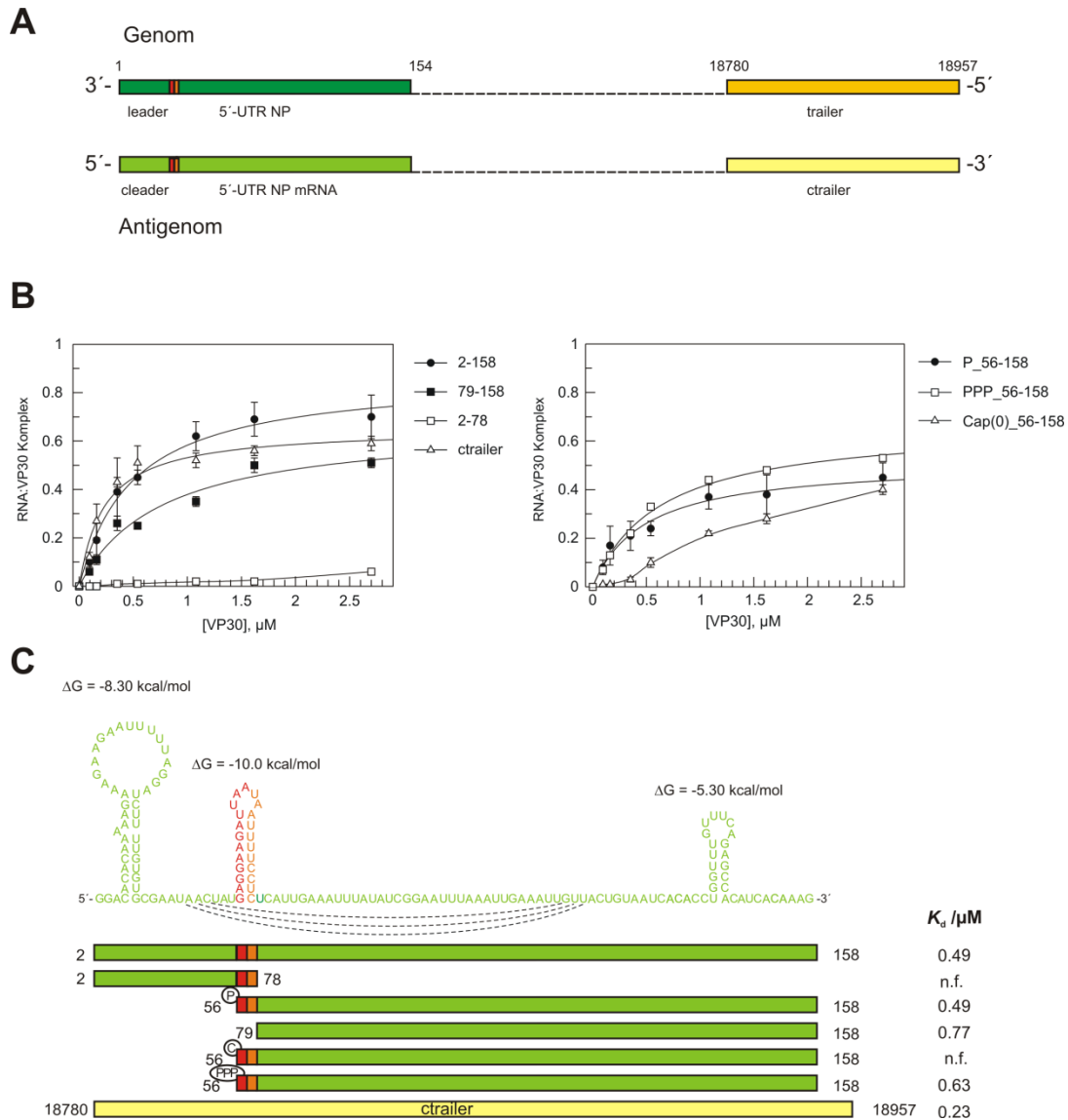


Abb. 29 Ergebnisse der Deletionsanalyse auf Antigenomebene. **(A)** Schema der ausgewählten RNA-Substrate mit entsprechender Farbgebung. In die antigenomischen Analysen wurde das RNA-Substrat ctrailer einbezogen, das dem 3'-Bereich des Antigenoms (nt 18780-18957) entspricht. **(B)** Bindungskurven der verschiedenen RNA-Substrate. Links: die Deletion des unstrukturierten Bereiches führte zu einer starken Abnahme der Bindungsaffinität (vgl. Substrate 2-158 vs. 2-78); ebenso wie auf Genomebene zeigte die Deletion der strukturierten Region keinen Einfluss auf die Affinität (Substrat: 56-158), während die Wegnahme der Haarnadelstruktur (nt 56-78; Substrat 79-158) erneut eine Verschlechterung der Affinität nach sich zog; die komplementäre trailer-Region (ctrailer) zeigte eine relativ hohe Bindungsaffinität; rechts: bei Verwendung verschiedener 5'-Modifikationen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Mono- und Triphosphat beobachtet werden; dagegen führte die Cap(0)-Modifikation zu einer deutlichen Beeinträchtigung der RNA-Bindung. **(C)** Übersicht über die Affinitäten der verwendeten Substrate. Die RNA-Sequenz zeigt die experimentell ermittelten Strukturelemente mit der jeweils vorhergesagten Stabilität. Während eine Deletion am 5'-Ende die Affinität nicht beeinflusste (56-158), konnte nach Deletion des einzelsträngigen Bereiches am 3'-Ende nur noch eine basale Komplexbildung beobachtet werden (2-78). Die Deletion der zweiten Haarnadelstruktur führte zu einer Verschlechterung der Affinität um den Faktor 1.6. Im Fall verschiedener 5'-Modifikationen scheint eine Cap(0)-Modifikation die Bindung stark negativ zu beeinflussen. Eine Bindung an die komplementäre trailer-Region (ctrailer) wurde mit einer vergleichsweise hohen Affinität gemessen (n.f. = *no fitting*, keine K_d -Kalkulation möglich)

Auf antigenomischer Ebene wurde ebenfalls eine Deletionsanalyse durchgeführt, die die Tendenzen der genomischen Substrate bestätigte (s. Abb. 29 B und C): (i) die Entfernung der unstrukturierten Region am 3'-Ende resultierte in einer starken Affinitätsabnahme (Substrat: 2-78; basale Komplexbildung vorhanden, aber keine K_d -Kalkulation möglich), (ii) bei der Deletion des strukturierten Bereiches am 5'-Ende war kein signifikanter Einfluss auf die Affinität zu beobachten (Substrat: 56-158), (iii) der zweiten Sekundärstruktur (nt 56-78) konnte erneut eine besondere Bedeutung zugewiesen werden, da nach deren Deletion eine Abnahme der Affinität um den Faktor 1.6 detektiert wurde (Substrat: 79-158). Damit ist der Effekt zwar nicht so ausgeprägt wie auf Genomebene (Faktor: 2.5), aber dennoch vorhanden. Generell war auch hier bei Kürzung der Substrate eine Reduktion des Anteils der gebundenen RNA zu beobachten (s. Abb. 29 B).

Da VP30 auf Grundlage der hier gezeigten RNA-Bindungsdaten keine eindeutige Präferenz für die genomischen oder antigenomischen Substrate zeigte, wurde ein weiteres Substrat miteinbezogen, das die komplementäre *trailer*-Region (hier als *ctrailer* bezeichnet) beinhaltet. Grund hierfür war die hohe Sequenzidentität zwischen Genom und *ctrailer* innerhalb der ersten 50 Nukleotide (s. Abb. 8) und die Tatsache, dass der *trailer*-Region bei der Transkription keine funktionelle Rolle zukommt. Man könnte deshalb aus der physiologischen Perspektive erwarten, dass VP30 nicht oder mit verminderter Affinität an die *ctrailer*-Region bindet.

Es wurden die ersten 179 Nukleotide der komplementären *trailer*-Region als Substrat gewählt, da diese die funktionelle Einheit des Replikationspromotors in diesem Bereich bilden [120]. Die RNA-Bindungsstudie mit diesem Substrat zeigte jedoch, dass auch dieses Substrat mit relativ hoher Affinität ($K_d(\text{ctrailer})$: 0.23 μM ; s. Abb. 29) gebunden wird, was auf einen unspezifischen Charakter der VP30:RNA-Bindung hindeutet.

Die hier vorgestellten Deletionsstudien (s. Abb. 28 und Abb. 29) zeigten eine Präferenz für einzelsträngige Bereiche und deuteten auf eine bindungs-unterstützende Rolle der zweiten Haarnadelstruktur (nt 56-78) hin. Im Hinblick auf den physiologischen Kontext kann festgestellt werden, dass VP30 *in vitro* nicht signifikant zwischen Genom (154-1), Antigenom (2-158) und *ctrailer* unterscheiden kann. Als weitere Kontrolle zur Bestätigung der präferenziellen Bindung an Einzelstrang-RNA wurde ein komplett doppelsträngiges virales RNA-Substrat erzeugt, indem die Substrate 154-1 und 2-158 hybridisiert wurden. Wie erwartet konnte keinerlei Bindung zu diesem Substrat detektiert werden (s. Abb. 28 A links). Ein weiterer interessanter Aspekt war der Einfluss von 5'-Modifikationen, da im Fall von VP35 gezeigt werden konnte, dass die Affinität zur RNA von verschiedenen 5'-Modifikationen stark beeinflusst wird [121]. Hierfür wurde das Substrat, das den 5'-terminalen Bereich der viralen mRNA repräsentiert (nt 56-158), mit verschiedenen 5'-

Modifikationen (5'-Monophosphat, 5'-Triphosphat und 5'-Kappe (Cap(0))) versehen und die RNA-Varianten bezüglich ihrer Bindung an VP30 vergleichend analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass zwischen RNAs mit Mono- oder Triphosphat nur ein schwacher Unterschied in den Affinitäten bestand. Physiologisch war jedoch in erster Linie der Vergleich zwischen Triphosphat und Cap(0)-Modifikation relevant. Hierbei konnte eine starke Reduktion der Bindungskompetenz des Substrates gezeigt werden, wenn es eine 5'-Cap(0) trug. Dies ist besonders vor dem Hintergrund interessant, dass die Modifikation der mRNAs mit einer 5'-Kappe wahrscheinlich simultan zur Transkription durch die Polymerase L erfolgt [83]. Eine mögliche Bindung von VP30 an die virale mRNA könnte durch Einführung der Modifikation deutlich geschwächt werden. Eine denkbare Interpretation wäre, dass im Fall einer Bindung von VP30 an die 5'-terminale Region der mRNA die Einführung der 5'-Kappe zu einer Dissoziation des Proteins von der mRNA verhilft und damit für erneute Transkriptionsinitiationen zur Verfügung steht.

3.2.2.2 RNA-Bindungsuntersuchungen zum Einfluss einer terminalen Haarnadelstruktur

Da sowohl auf Ebene des Genoms als auch auf Ebene des Antigenoms die Haarnadelstruktur (nt 56-78) eine Rolle bei der RNA-Bindung durch VP30 zu spielen scheint (s. Kap. 3.2.2.1), wurde dieser Aspekt genauer untersucht (s. Abb. 30).

Hierfür wurde zunächst ein Substrat verwendet, das die Haarnadelstruktur auf Genomebene repräsentiert (nt 80-46; Haarnadelstruktur: nt 78-56). Mit diesem Substrat interagiert VP30 nur sehr ineffizient, was bedeutet, dass der positive Effekt auf die RNA-Bindung nicht durch eine direkte Bindung an die Haarnadelstruktur selbst ausgelöst wurde. Als nächster Schritt wurden die Haarnadelstrukturen auf Genom und Antigenom miteinander vertauscht, um zu evaluieren, ob ein spezifisches Zusammenspiel zwischen der Sekundärstruktur und dem folgenden einzelsträngigen Bereich notwendig ist, um die Bindung zu verstärken (s. Abb. 30 A). Hierbei konnte beobachtet werden, dass auch mit vertauschten Haarnadelstrukturen die Bindung wieder auf eine nahezu identische Affinität wie bei den Wildtyp-Substraten gebracht werden konnte (s. Abb. 30 B).

Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass VP30 bevorzugt an RNA bindet, die einen maßgeblichen einzelsträngigen Anteil besitzt, was jedoch durch die Positionierung einer stabilen Haarnadelstruktur am terminalen 3'- oder 5'-Ende zusätzlich unterstützt werden kann. Interessanterweise scheint die Bindung bei Manipulation der Haarnadelstruktur auf Antigenom-Ebene (also am 5'-Ende des einzelsträngigen Bereiches) sensibler gegenüber dieser eingeführten Veränderung zu sein als am 3'-Ende, was sich zwar nicht in der Affinität, jedoch im erhöhten Bindungsplateau bei Austausch der antigenomischen mit der genomischen Haarnadel bemerkbar machte. Eine stabile Bindung an das Strukturelement selbst konnte durch Verwendung der RNA nt 80-46 ausgeschlossen werden (s. Abb. 30 B).

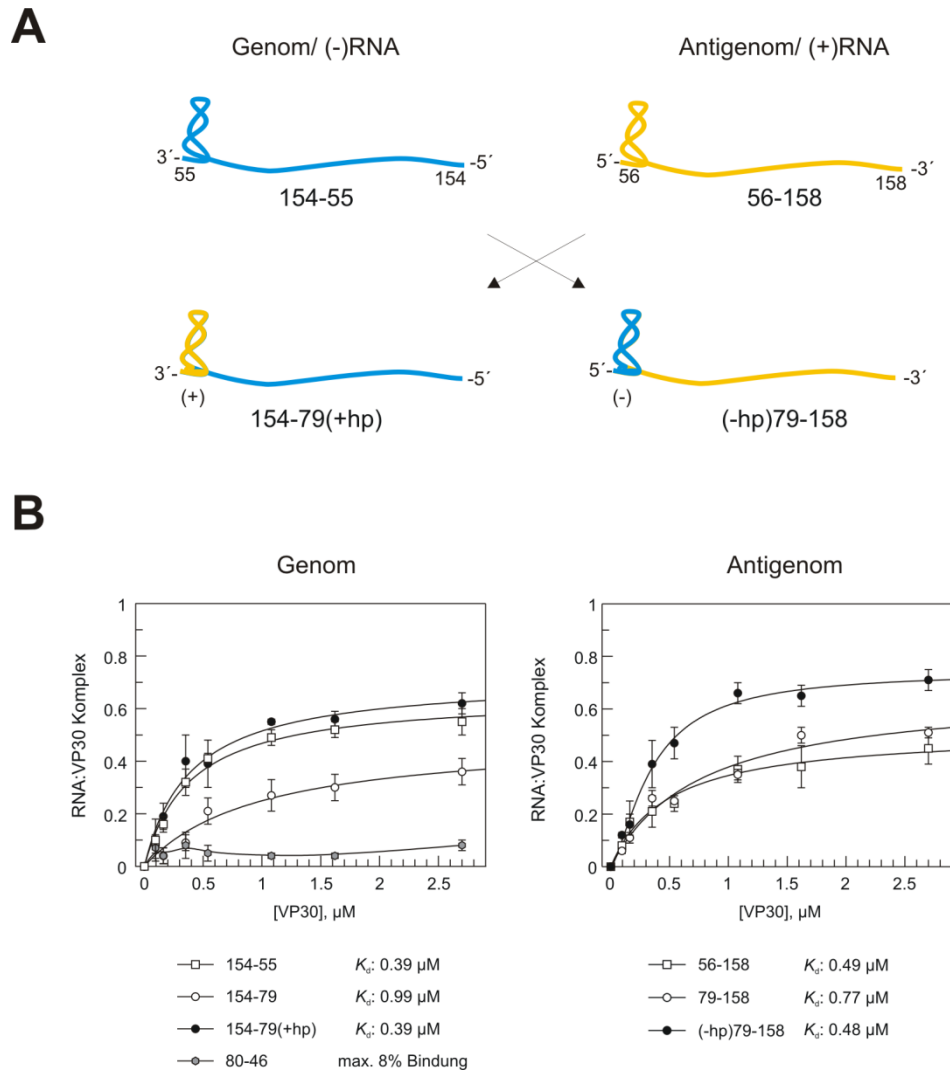


Abb. 30 Untersuchungen zum Einfluss der Haarnadelstruktur auf die VP30:RNA-Interaktion. **(A)** Schema der verwendeten RNA-Substrate. Ausgehend von den Substraten 154-55 und 56-158 wurden die Haarnadelstrukturen vertauscht, so dass das genomische Substrat die Haarnadelstruktur des Antigenoms (= 154-79(+hp)) und das antigenomische Substrat die Haarnadelstruktur des Genoms (= (-hp)79-158) erhielt. **(B)** Ergebnis der Bindungsuntersuchungen. Links: ein RNA-Substrat, das die Haarnadelstruktur und nur eine kurze einzelsträngige Flanke des Genoms enthält (80-46) konnte kaum (maximal 8%) gebunden werden. Wurde an die einzelsträngige Region des Genoms (nt 79-154) die antigenomische Haarnadel angehängt (siehe (A)), so konnte eine Affinität wiederhergestellt werden, die der des genomischen Ausgangssubstrates (nt 154-55) entsprach. Rechts: auch im umgekehrten Fall konnte die Affinität des antigenomischen Substrates nt 79-186 nach Fusion mit der genomischen Haarnadel (=(-hp)79-158) wieder auf das Niveau des Referenzsubstrates nt 56-158 gebracht werden. Zusätzlich konnte in diesem Fall eine deutliche Erhöhung des Anteils der bindungskompetenten RNA durch Fusion der genomischen Haarnadel an das 5'-Ende des antigenomischen Substrates 79-158 erreicht werden.

3.2.2.3 Hybridisierungs-Scan der RNA 154-1 mittels DNA-Sonden

Um die gezeigten Ergebnisse durch einen zweiten Ansatz zu verifizieren, wurde eine Hybridisierung mittels DNA-Sonden durchgeführt. Hierbei wurde das genomische Ausgangssubstrat (nt 154-1) verwendet und verschiedene Bereiche mit einem DNA-Oligomer bedeckt (s. Abb. 31 A). Ausgangspunkt war hier, dass doppelsträngige Bereiche nur eine untergeordnete Rolle bei der VP30-Bindung zu spielen scheinen und die relevanten

einzelsträngigen Bereiche durch die Anlagerung einer DNA-Sonde unzugänglich gemacht werden, was sich wiederum in einer Abnahme der Bindungsaffinität manifestieren sollte.

Es wurden vier verschiedene Sonden entworfen, von denen eine an einen doppelsträngigen und die übrigen drei an den experimentell bestimmten einzelsträngigen Bereich hybridisieren. Die Sonden wurden an das RNA-Substrat über ein Temperaturprogramm angelagert und dies auf einem nativen PAA-Gel überprüft (s. Abb. 31 A und B und Kap. 2.7.5).

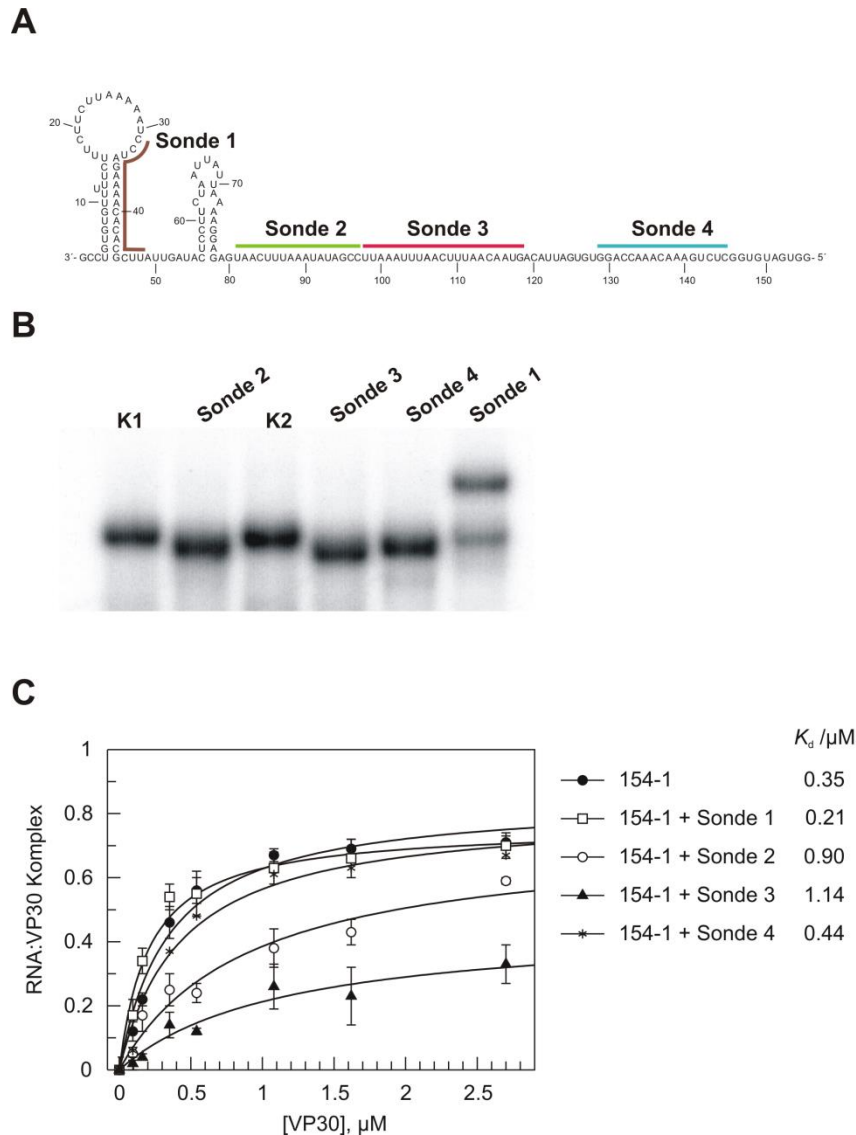


Abb. 31 Hybridisierungsexperiment. **(A)** Schema der gewählten DNA-Sonden zum Bedecken verschiedener Bereiche im RNA-Substrat 154-1. Sonde 1 ist gegen eine doppelsträngige Region gerichtet, während die Sonden 2-4 im einzelsträngigen Bereich hybridisieren. **(B)** Detektion der DNA:RNA-Hybride im nativen PAA-Gel (10%) über das radioaktiv markierte RNA-Substrat 154-1. Sonde 1 bindet an eine doppelsträngige Region und führte zu einer Retardierung des Laufverhaltens der markierten RNA im RNA:DNA-Komplex. Die Sonden 2-4 hybridisieren an einzelsträngige Regionen, was zu einer erhöhten Mobilität führte. K1 = RNA-Substrat 154-1; K2 = RNA-Substrat mit einer DNA-Sonde, die nicht an die RNA hybridisieren konnte. **(C)** Ergebnis der Bindungsstudien. Im Vergleich zum Substrat 154-1 allein wurde die Affinität durch die Hybridisierung der Sonden 1 und 4 nicht signifikant beeinflusst. Die Sonden 2 und 3 schwächten die Affinität etwa um den Faktor 3.

Während Sonde 1 zu einem retardierten Laufverhalten im nativen Gel führte, wurde die Mobilität der RNA durch die Sonden 2-4 beschleunigt. Das Laufverhalten ließ den Schluss zu, dass Sonde 1 in einen bereits doppelsträngigen Bereich der RNA invadierte, während die Sonden 2-4 einen einzelsträngigen Bereich in einen doppelsträngigen umwandelten. Mit den DNA:RNA-Hybriden wurden anschließend die VP30-Bindungsstudien durchgeführt.

Die mit diesem Ansatz erhaltenen Ergebnisse bestätigten die Tendenzen der Deletionsstudien. Die Sonde 1 invadierte in eine Haarnadelstruktur und löste dabei keine Verschlechterung der Affinität aus, was die Annahme bestärkte, dass dieser Bereich für die RNA-Bindung irrelevant ist. Sonde 2 bedeckte die Region in direkter Nähe zur Haarnadelstruktur und führte zu einer Reduktion der Bindungsaffinität um den Faktor 2.6 im Vergleich zur RNA 154-1 allein. Sonde 3 unterbrach durch die Hybridisierung die durchgängig einzelsträngige Region des RNA-Substrats und führte damit ebenfalls zu einer Schwächung (ca. 3.3-fach im Vergleich zum RNA-Substrat 154-1) und zusätzlich zu einer starken Beeinträchtigung des bindungskompetenten RNA-Anteils (zu sehen an der Reduktion des experimentellen Endpunkts). Sonde 4 wurde nahe dem 5'-Terminus des RNA-Substrates positioniert und zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die VP30-Affinität.

Auf Basis dieser Ergebnisse konnte der Einzelstrangbereich in direkter Nähe zur zweiten Haarnadelstruktur (Sonde 2) sowie die angrenzende Einzelstrangregion (Sonde 3) als die für die VP30-Bindung relevantesten Bereiche bestätigt werden.

3.2.3 Untersuchung der RNA-Bindung anhand nicht-viraler Substrate

Um die generellen Substratanforderungen von VP30 vertiefend zu analysieren, wurden RNAs untersucht, die eine verifizierte charakteristische Struktur besitzen. Hierzu gehörten der Vorläufer einer tRNA^{Gly} (ptRNA^{Gly} bzw. ptRNA; ca. 90 nt) aus *Thermus thermophilus* (zur Verfügung gestellt von Dominik Helmecke) und die 6S RNA aus *Aquifex aeolicus* (ca. 180 nt; zur Verfügung gestellt von Dr. Karen Köhler; [122]).

Die ptRNA besitzt einzelsträngige Sequenzen am 5'- und 3'-Ende (14 und 7 nt) sowie eine zentrale strukturierte Region, während die 6S RNA zwei terminale doppelsträngige Regionen und eine zentrale weitgehend einzelsträngige Region aufweist (s. Abb. 32 A). Interessanterweise war VP30 in der Lage die ptRNA mit einer apparenten K_d von 2.72 μM zu binden, während mit der 6S RNA keinerlei Komplexe detektiert werden konnten (s. Abb. 32 B). Um den Einfluss terminaler Einzelstrangsequenzen zu überprüfen, wurden zwei weitere tRNA-Varianten mit einbezogen (zur Verfügung gestellt von Dr. Markus Gößringer), und zwar eine 5'-mature tRNA (ohne 5'-leader im Vergleich zur ptRNA) sowie eine ΔCCA -ptRNA (ohne 3'-trailer im Vergleich zur ptRNA; s. Abb. 32 A)

Beide Varianten wurden von VP30 signifikant schlechter gebunden als die ptRNA, was den Eindruck bestätigte, dass VP30 einzelsträngige terminale Regionen erkennt, die zudem eine bestimmte Mindestlänge aufweisen müssen (s. Abb. 32 B).

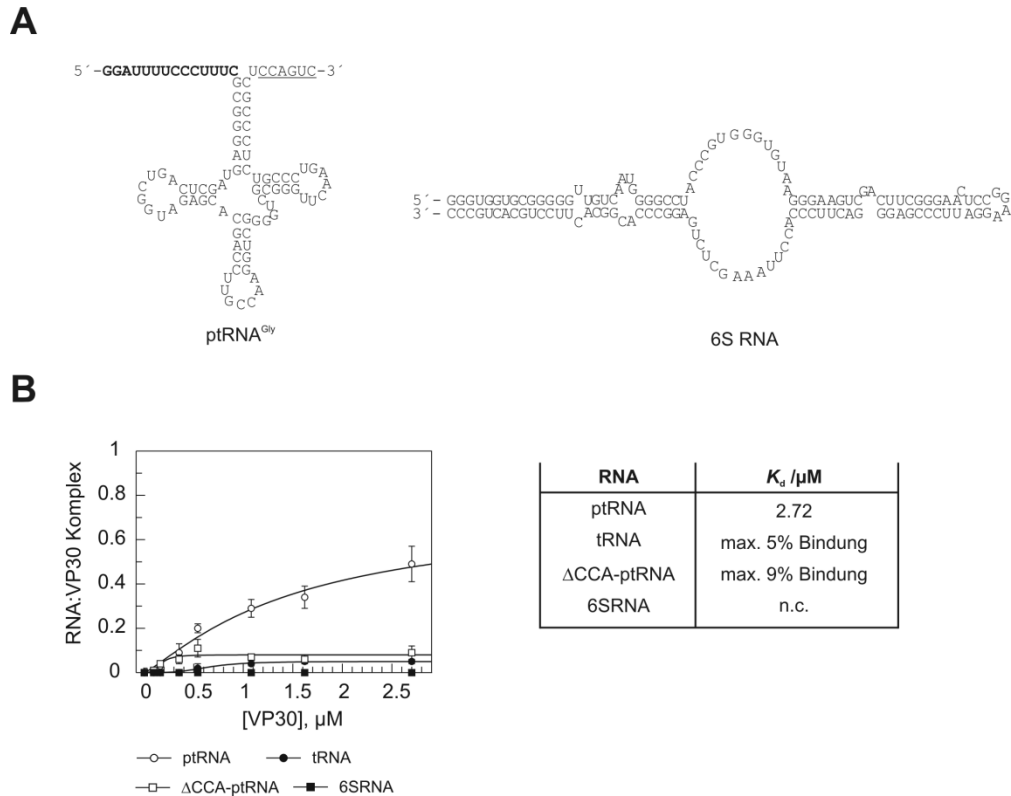
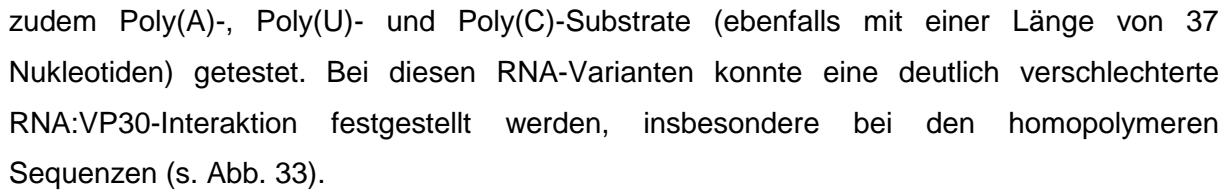


Abb. 32 Untersuchung der VP30:RNA-Bindung mit strukturell verifizierten RNA-Substraten. **(A)** Die Vorläufer-tRNA^{Gly} aus *Thermus thermophilus* (ptRNA^{Gly}; links) besitzt einzelsträngige 5'-*leader*- und 3'-*trailer*-Sequenzen; der Bereich dazwischen ist stark strukturiert; tRNA bezeichnet die gleiche RNA, jedoch ohne 5'-Flanke (hervorgehoben in fett), während im Fall des $\Delta\text{CCA-ptRNA}$ -Substrates der 3'-*trailer* deletiert wurde (markiert durch unterstrichene Basen); die 6S RNA aus *Aquifex aeolicus* (rechts) zeichnet sich durch zwei sehr stabile terminale doppelsträngige Bereiche und eine einzelsträngige Region im Zentrum aus. **(B)** Ergebnis der Bindungsexperimente mittels EMSA; für die ptRNA wurde ein K_d -Wert von 2.72 μM bestimmt; die beiden anderen tRNA-Varianten zeigten nur eine maximale Komplexbildung von 5% (tRNA) bzw. 9% ($\Delta\text{CCA-ptRNA}$), während die 6S RNA keinerlei Interaktion mit VP30 einging (n.c. = *no complexes*, keine RNA:VP30-Komplexbildung detektierbar).

Um die Bindung an einzelsträngige RNA genauer zu untersuchen, wurde die 14-nt lange 5'-*leader*-Region der ptRNA als isoliertes Substrat verwendet und auf Basis dieser Sequenz bis auf 42 Nukleotide verlängert (s. Abb. 33 A). Während sich das 14-nt Substrat als bindungsaktiv erwies, so konnte durch seine sukzessive Verlängerung eine stetige Steigerung der Affinität erreicht werden. Die maximale Affinität lag hierbei bei 0.76 μM für das einzelsträngige CU-reiche Substrat mit einer Länge von 37 Nukleotiden (s. Abb. 33 B). Da die zunächst getesteten RNA-Substrate CU-reich (79-88%) waren, stellte sich die Frage nach einer möglichen Sequenzspezifität. Hierfür wurde ein dem 37 nt CU-reichen RNA-Substrat komplementäres GA-reiches RNA-Substrat getestet, das im EMSA eine sehr ähnliche Affinität zeigte (K_d (CU-reich): 0.76 μM vs. K_d (GA-reich): 0.61 μM ; s. Abb. 33). Neben einem 37-mer mit Wiederholungen des Dinukleotids GA (genannt: *GA-repeat*) wurden



Die hier erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass VP30 keine signifikante Sequenzpräferenz besitzt, jedoch gemischte gegenüber homopolymeren Substraten bevorzugt.

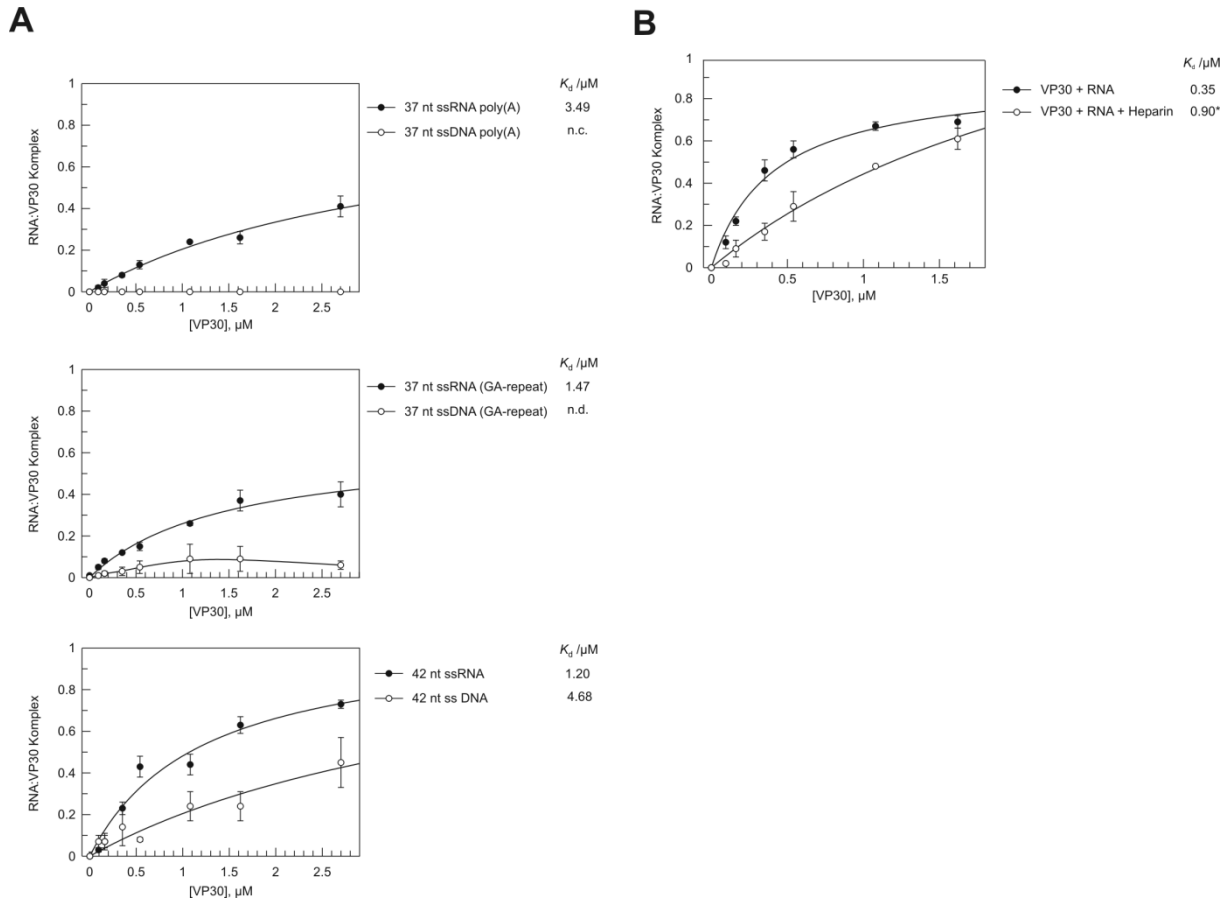


Abb. 34 Untersuchung zur Spezifität der RNA:VP30-Interaktion. **(A)** VP30-Bindung von RNA im Vergleich zu DNA. Drei verschiedene RNA-Substrate wurden im Vergleich zu ihrem DNA-Pendant analysiert (37 nt ssRNA vs. ssDNA poly(A), 37 nt ssRNA vs. ssDNA (GA-repeat) und 42 nt ssRNA vs. ssDNA); in allen Fällen konnte eine eindeutige Präferenz für RNA beobachtet werden, die im Fall des 42-nt Substrats zu einem ca. 4-fachen Affinitätsunterschied führte. Für die anderen beiden Substrate konnte im Fall der DNA-Variante aufgrund der niedrigen Komplexbildung kein K_d -Wert bestimmt werden. **(B)** Ergebnis des Konkurrenzexperimentes. Heparin wurde äquimolar zur RNA hinzugegeben, wobei zur Abschätzung der molekularen Masse die häufigste Spezies von Heparin zugrunde gelegt wurde (ca. 15 000 g/mol). Im Vergleich zur Kontrolle ohne Heparin konnte eine starke Verdrängung des RNA:VP30-Komplexes beobachtet werden, die einer Verschlechterung der Affinität um den Faktor 3 entsprach (* der K_d -Wert wurde hier als die VP30-Konzentration abgeschätzt, bei der die halbmaximale Komplexbildung bezogen auf die maximale Komplexbildung bei 2.7 μM VP30 erreicht wurde).

Zur Abschätzung der elektrostatischen Komponente der VP30:RNA-Interaktion wurde ein Konkurrenzexperiment mit Heparin durchgeführt. Heparin ist ein Polyanion, dessen Ladungsverteilung der von Nukleinsäuren ähnelt. Es wird in der Regel verwendet, um unspezifische Protein:Nukleinsäure-Interaktionen zu unterbinden.

Bei Anwesenheit von äquimolaren Mengen von Heparin und RNA (wobei zur Abschätzung der molekularen Masse die am häufigsten vorkommende Heparin-Spezies von ca. 15 kDa verwendet wurde) wurde eine Inhibition der RNA:VP30-Komplexbildung um einen Faktor von etwa 3 beobachtet (s. Abb. 34 B). Das Ergebnis ließ darauf schließen, dass die VP30:RNA-

Bindung maßgeblich von elektrostatischen Wechselwirkungen geprägt ist, was auch mit den bisherigen Beobachtungen eines eher unspezifischen Bindungscharakters korrelierte.

Neben der Bewertung der Rolle des Phosphat-Rückgrats bei der VP30:RNA-Interaktion, wurde im nächsten Schritt überprüft, ob VP30 in der Lage ist zwischen RNA und DNA zu unterscheiden (s. Abb. 34 A). Insgesamt wurden drei verschiedene RNA-Substrate mit ihren DNA-Pendants verglichen. In allen Fällen war die Bindung an RNA gegenüber DNA stark bevorzugt (Affinitätsunterschied ca. Faktor 4), wobei eine Bindung von VP30 an DNA generell möglich zu sein scheint. Dies spricht dafür, dass auch 2'-OH-Gruppen an der VP30:RNA-Interaktion beteiligt sind.

3.2.4 Zusammenfassung und Diskussion

Ziel dieses Projekts war es, die RNA-Bindungseigenschaften von VP30 *in vitro* zu charakterisieren und durch Verwendung verschiedener Substrate die Substratanforderungen sowie mögliche Bindungsstellen von VP30 zu identifizieren. Dabei wurden neben nicht-viralen (strukturell bekannten) RNA-Substraten vor allem virale Substrate auf Basis der regulatorischen Sequenzen des Ebolavirus-Genoms verwendet, deren potenzielle Sekundärstrukturelemente zuvor bioinformatisch und experimentell ermittelt wurden.

Auf Basis von insgesamt 40 verschiedenen Substraten bzw. Substratkombinationen können folgende Aussagen getroffen werden:

- (i) VP30 bindet einzelsträngige RNAs, jedoch keine durchgehend doppelsträngigen RNAs,
- (ii) die Länge des einzelsträngigen Bereiches spielt eine wichtige Rolle im Hinblick auf Affinität und Bindungsplateau, wobei ein Affinitätsoptimum bei ca. 37 nt beobachtet werden konnte,
- (iii) VP30 besitzt zwar keine erkennbare Sequenzspezifität, zeigt aber eine Präferenz für gemischte Sequenzen,
- (iv) die RNA:VP30-Interaktion zeichnet sich durch eine starke elektrostatische Komponente aus,
- (v) VP30 bevorzugt RNA gegenüber DNA,
- (vi) die Bindung an RNA kann durch eine terminale Haarnadelstruktur (5'- oder 3'-Ende) verstärkt werden,
- (vii) die Bindung von VP30 an RNA kann durch Einführung einer 5'-Kappe deutlich beeinträchtigt werden und
- (viii) VP30 scheint das virale genomische Substrat nt 154-1 in der einzelsträngigen Region nahe der Haarnadelstruktur (nt 78-56) zu binden.

Aus diesen Daten lässt sich ein Minimalsubstrat ableiten, das aus einer heterogenen einzelsträngigen RNA-Sequenz mit einer Länge von ca. 37 Nukleotiden besteht (s. Abb. 35 A). Das optimale Substrat für VP30 scheint auf Basis der hier vorgestellten Daten eine RNA zu sein, die neben dem einzelsträngigen Bereich mit einer Länge von mindestens ca. 37 Nukleotiden an ihrem 3'-oder 5'-Ende eine stabile Haarnadelstruktur besitzt (s. Abb. 35 B).

In der bisher einzigen Studie zur RNA-Bindungsaktivität von VP30 wurden einige kurze (25-45 nt lange) Ebolavirus-basierte RNA-Substrate verwendet und ihre Bindung an VP30 mittels

UV-crosslinking und Filterbindungsexperimenten untersucht [90]. Die dabei erhaltenen Substratpräferenzen wurden auf Basis von Absolutanteilen der gebundenen RNA-Substrate begründet und weder Affinitäten noch das Vorhandensein verschiedener RNA:VP30-Komplexpopulationen berücksichtigt (letzteres spielte vor allem bei Verwendung verschiedener VP30-Mutanten eine wichtige Rolle, s. Kap. 3.3).

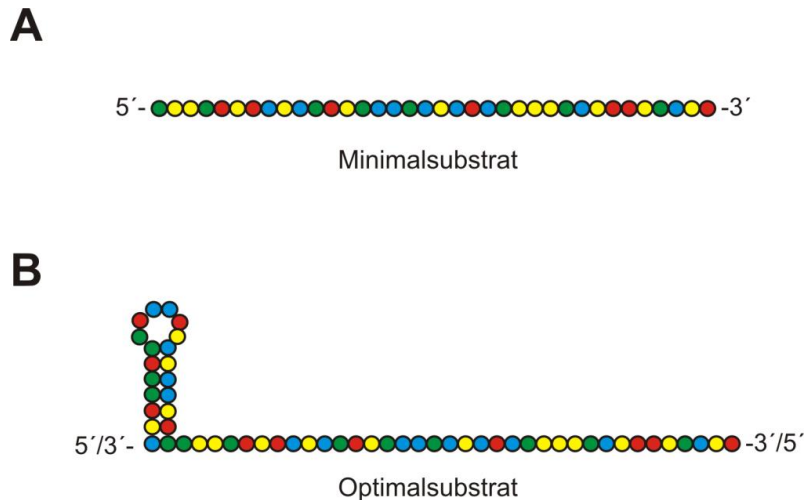


Abb. 35 Schema der Anforderungen von VP30 an ein bindungskompetentes RNA-Substrat. **(A)** Das aus den hier vorgestellten Daten abgeleitete Minimalsubstrat besteht aus einer heterogenen einzelsträngigen RNA-Sequenz mit einer Mindestlänge von ca. 37 Nukleotiden. **(B)** Ein mögliches Optimalsubstrat für VP30 besteht aus dem in (A) gezeigten einzelsträngigen Bereich kombiniert mit einer Haarnadelstruktur am 3'-oder 5'-Ende. Die verschiedenfarbigen Kreise repräsentieren die vier RNA-Nukleotide.

Die Ergebnisse der Studie [90] wurden dahingehend interpretiert, dass VP30 spezifisch Ebolavirus-basierte RNA und hierbei präferenziell ein Substrat bestehend aus der Haarnadelstruktur (nt 56-78) mit einer Extension am 3'- oder 5'- Ende (ca. 20 Nukleotide) bindet (nt 36-80; gleichermaßen auf Genom- sowie auf Antigenomebene). Auch wurde der Schluss gezogen, dass v.a. einzelsträngige Bereiche zur RNA-Bindung beitragen. Ein Substrat, das die Nukleotide 54-80 einschloss (= Haarnadelstruktur mit zwei Nukleotiden 5'- und 3'-Überhang) führte in dieser Studie, ähnlich wie ein doppelsträngiges Substrat, nur noch zu einer basalen Komplexbildung von ~10% (im Vergleich zum besten Substrat nt 36-80) und wurde damit als möglicher Bindungspartner ausgeschlossen [90].

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die in der Studie von John *et al.* [90] vorgestellten Substrat-Präferenzen bestätigt und zusätzlich durch Verwendung weiterer Substrate, verschieden kombinierter Ansätze und vor allem durch Bestimmung von apparenten K_d -Werten präzisiert und differenziert werden.

Bei den EMSA-Bindungsstudien wurden nicht nur RNA-Substrat-abhängige Affinitätsunterschiede, sondern auch starke Effekte auf das Bindungsplateau bzw. den komplexierten RNA-Anteil am experimentellen Endpunkt beobachtet. Als Beispiel kann an

dieser Stelle der Vergleich der Bindungskurven im Zuge der Deletionsanalyse des genomischen Substrates 154-1 angeführt werden. Hierbei konnte eine Abnahme des Bindungsplateaus in Korrelation mit der Kürzung der RNA-Substrate beobachtet werden (s. Abb. 28). Ein Plateau von 30% würde darauf hindeuten, dass 30% der angebotenen RNA in einer bindungskompetenten Konformation vorlag, was im Fall der RNA 80-1 beispielsweise auf ein partielles Aufschmelzen der beiden Sekundärstrukturen zurückgeführt werden könnte. Eine Folgerung hieraus wäre, dass dieser Effekt vor allem bei strukturierten Substraten auftritt, was damit im Einklang steht, dass die verwendeten ssRNA-Substrate (s. Abb. 33 A) keinen markanten Plateau-Effekt zeigten. Auf diese Beobachtung wurde an hier aus zwei Gründen explizit eingegangen: (i) dieser Effekt war Grundlage der Analyse der Bindungseigenschaften in der Studie von John *et al.* [90] und wurde dort mit vergleichbaren Tendenzen beobachtet und (ii) diese Beobachtung kann als weitere Bestätigung für die Einzelstrangabhängigkeit der RNA:VP30-Bindung angesehen werden.

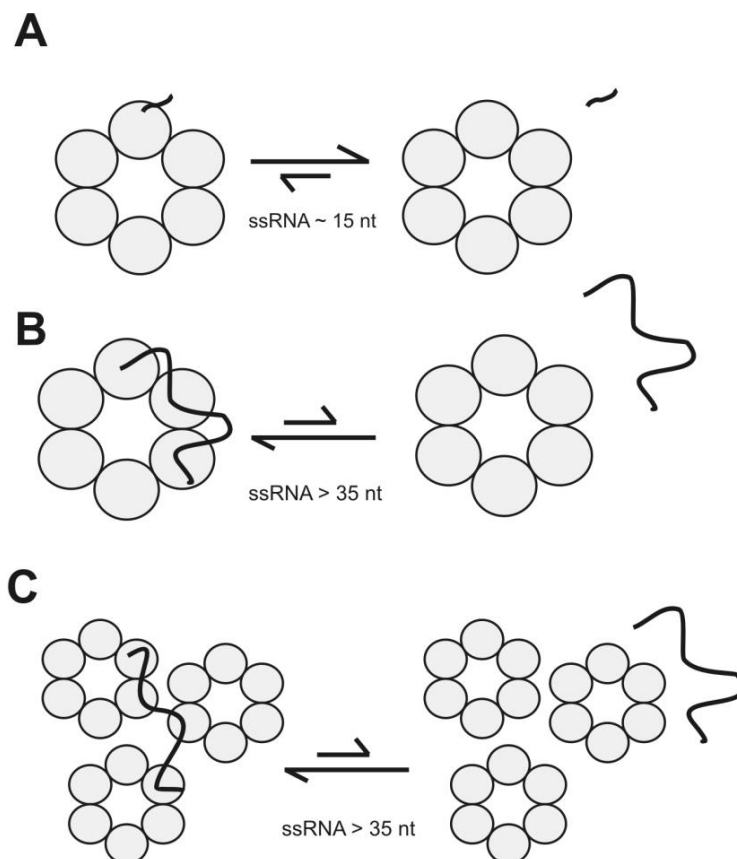


Abb. 36 Modell zur längenabhängigen RNA-Bindung. **(A)** Eine kurze (ca. 15 nt) RNA wird nur von einem Monomer von VP30 gebunden, was eine unzureichende Stabilität der VP30:RNA-Komplexbildung zur Folge hat; die Dissoziation der RNA von VP30 wäre in diesem Fall bevorzugt. **(B)** Längere Substrate (ca. 35 nt) haben die Möglichkeit von mehreren VP30-Untereinheiten stabil gebunden zu werden, was die Detektion von RNA:VP30-Komplexen ermöglicht. **(C)** Das Auftreten höhermolekularer RNA:VP30-Spezies könnte auf die Bindung der RNA durch Untereinheiten verschiedener VP30-Hexamere erklärt werden.

Aufgrund der beobachteten Längenabhängigkeit der Affinität von VP30 zu einzelsträngigen RNA-Substraten lassen sich folgende Szenarien zur RNA-Bindung vermuten: wird eine kurze

RNA (ca. 15 nt) als Substrat angeboten, kann diese aufgrund der zu geringen Zahl an Kontaktstellen nicht affin genug gebunden werden, was zu hohen Dissoziationsraten und damit keiner Gel-auflösbaren Komplexbildung führt (s. Abb. 36 A). Wird das Substrat auf ca. 35 nt verlängert, kann eine stabile RNA:VP30-Bindung erreicht werden, indem z.B. die RNA durch mehrere Untereinheiten eines Hexamers simultan gebunden wird (s. Abb. 36 B und vgl. Abb. 37). Das Auftreten von höhermolekularer RNA:VP30-Spezies könnte durch die Bindung einer RNA von Untereinheiten verschiedener VP30-Hexamere gleichzeitig oder durch das Zusammenlagern von VP30-Hexameren mit gebundener RNA erklärt werden (s. Abb. 36 C).

VP30 wird häufig mit dem Antiterminator M2-1 (RSV) verglichen, dem einzigen bekannten Protein innerhalb der *Mononegavirales*, das eine zu VP30 ähnliche Funktion ausübt (s. Kap. 1.3.3). In Untersuchungen zur RNA-Bindung von M2-1 konnte eine Präferenz für Poly(A)-Sequenzen nachgewiesen werden, die besonders in den 3'-terminalen Bereichen der RSV mRNAs zu finden sind [102,103]. Dies unterscheidet sich stark von den hier gefundenen Substrat-Präferenzen für VP30, die auf keinerlei Nukleotid-Spezifität hinwiesen. Das vorgeschlagene Modell für die RNA:M2-1-Bindung zeigt eine 1:1 Stöchiometrie, wobei ein Adenin (A5) direkt an die Zinkfinger-Domäne bindet, während die folgenden Nukleotide die gesamte RNA-bindende Region an der Oberfläche bedecken (s. Abb. 37). Die hier vorgestellten, stark längenabhängigen Bindungsaffinitäten von VP30 deuten darauf hin, dass auch im Fall von VP30 eine stabile Interaktion des RNA-Substrates neben der Zinkfinger-Domäne mit einer Reihe von Aminosäuren auf der VP30-Oberfläche stattfinden könnte (s. Kap. 3.3).

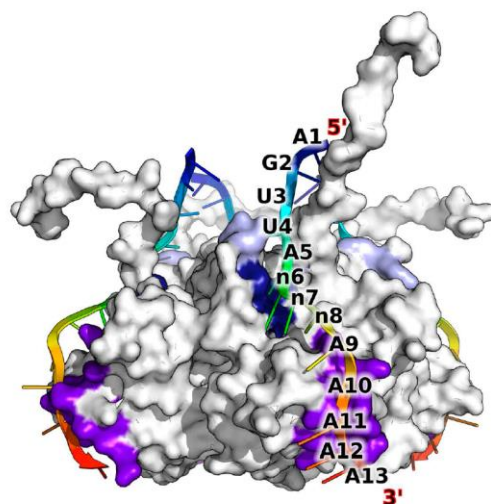


Abb. 37 Modell der RNA-Bindung von M2-1 für die Erkennung einer Konsensus-Sequenz an den mRNA-Enden (5'-AGUUAnnnAAAAA-3') durch M2-1; Aminosäuren, die in die RNA-Bindung involviert sind, sind violett hervorgehoben, die Aminosäuren des Zinkfinger-Motivs dunkelblau sowie positiv geladenen Aminosäuren hellblau; die RNA verläuft farblich von rot nach blau, in 5'-> 3'-Richtung (aus [104]).

3.3 Zusammenhang zwischen transkriptioneller Regulation und RNA-Bindungsfähigkeit von VP30

Die Identifikation von VP30 als RNA-Bindeprotein sowie die vorangegangene *in vitro* Charakterisierung seiner RNA-Bindungseigenschaften ließen noch keine Schlüsse zur physiologischen Bedeutung der RNA-Bindung zu. Aus diesem Grund war das Ziel eine mögliche Verbindung zwischen transkriptioneller Regulation und RNA-Bindung von VP30 nachzuweisen.

Die hier verwendeten Protein-Varianten wurden rekombinant in *E. coli* als MBP-Fusionsproteine exprimiert und aufgereinigt (s. Kap. 2.8.1). Vor Durchführung der K_d -Bestimmung mit Hilfe des modifizierten EMSA (s. Kap. 2.10.2.2) wurde eine Abspaltung des MBP-tag mittels TEV-Protease durchgeführt (s. Kap. 2.8.7). Für die hier gezeigten Experimente wurde stets das genomische Substrat, das den 3'-terminalen 154 Nukleotiden des Ebolavirus-Genoms entspricht, verwendet.

3.3.1 Einfluss des Phosphorylierungsstatus von VP30 auf die RNA-Bindung

Der Einfluss der Phosphorylierung von VP30 auf die Transkription war bereits Gegenstand einiger Studien [86,87,88], bisher konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen RNA-Bindung und Phosphorylierungszustand von VP30 gezeigt werden.

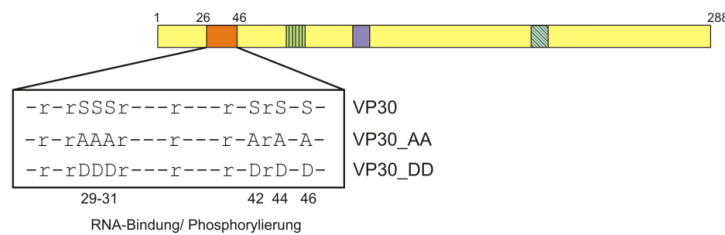
Hierfür wurden die bereits literaturbekannten VP30-Varianten VP30_AA und VP30_DD verwendet. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass bei der sogenannten VP30_AA-Variante die sechs N-proximalen Serine (S29-31, S42, S44, S46) durch Alanine ersetzt wurden, um eine vollständige Dephosphorylierung zu imitieren. Im Fall der VP30_DD-Mutante wurden die erwähnten Serine durch Aspartate ersetzt, um eine vollständige Phosphorylierung aufgrund der negativen Ladungen zu simulieren (s. Abb. 39 A).

Die bereits bekannten Phänotypen dieser Mutanten in Bezug auf die Regulation der Transkription sind eine starke Aktivierung der Transkription durch VP30_AA, die die des Wildtyp-Proteins sogar zu übersteigen scheint [87], und im Gegensatz dazu eine nahezu vollständige Inhibition der Transkription im Fall der VP30_DD-Variante [87,88]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen VP30 und VP35 ebenfalls vom VP30-Phosphorylierungsstatus abhängt: Während VP30_AA eine Interaktion mit VP35 eingeht, dissoziiert der Komplex im Fall von VP30_DD, das stattdessen eine erhöhte Präferenz für die Interaktion mit NP zeigte [88].

Ausgehend von der Hypothese, dass die VP30-abhängige transkriptionelle Regulation und RNA-Bindung funktionell miteinander verknüpft sind, sowie die Tatsache, dass das an der RNA-Bindung beteiligte N-proximale Arginin-Cluster mit den in den Varianten VP30_AA und

_DD mutierten Serin-Clustern überlappt, würde man bei diesem Experiment eine Abnahme der Affinität im Fall der VP30_DD-Variante aufgrund der elektrostatischen Repulsion zwischen gebundener RNA und Aspartat-Resten erwarten, während bei der VP30_AA-Variante keinerlei negativer Effekt auftreten sollte.

A



B

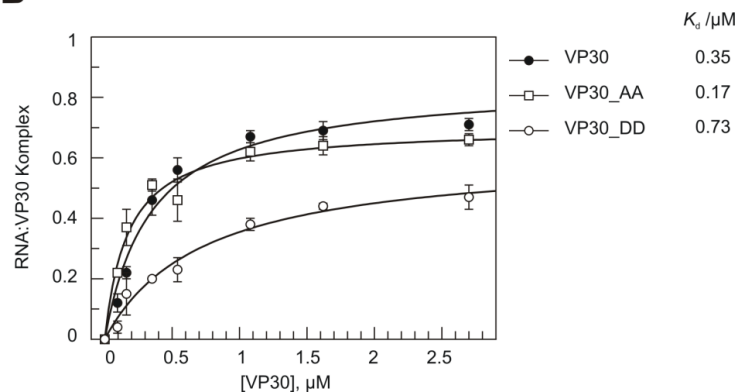


Abb. 39 Einfluss der Phosphorylierung auf die RNA-Bindung. **(A)** Schema der VP30-Varianten VP30_AA und VP30_DD. Die sechs N-proximalen Serine, die maßgeblich an der Phosphorylierung von VP30 beteiligt sind, wurden entweder mit Alaninen (VP30_AA; imitiert vollständige Dephosphorylierung) oder Aspartaten (VP30_DD; simuliert vollständige Phosphorylierung) ersetzt. **(B)** Ergebnis der Bindungsstudien mittels EMSA. Die Komplexe wurden quantifiziert und entsprechende K_d -Werte kalkuliert. Die Experimente wurden bei pH 8.0 durchgeführt ($n = 3-5$). Während die Affinität von VP30_AA relativ zu VP30 um das zweifache zunimmt, ist die Affinität von VP30_DD um Faktor 2.1 reduziert.

Die Bestimmung der Affinität über den K_d -Wert mittels EMSA ergab, dass VP30_AA eine um Faktor 2 höhere RNA-Affinität als das Wildtyp-Protein besitzt ($K_d(\text{VP30})$: 0.35 μM , $K_d(\text{VP30_AA})$: 0.17 μM), während VP30_DD eine um den Faktor 2.1 geringere Affinität zeigte ($K_d(\text{VP30_DD})$: 0.73 μM). Im direkten Vergleich unterscheiden sich die Varianten VP30_AA und VP30_DD also um den Faktor 4.3 in ihrer Affinität zur RNA, was in etwa mit dem ermittelten Einfluss der Mutationen (VP30_AA und VP30_DD) auf die Transkriptionsaktivierung korreliert [87,88].

Diese Ergebnisse bestärkten die Annahme, dass (i) die Region der sich überlappenden Cluster (Serine und Arginine; s. Abb. 39 A) an der RNA-Bindung beteiligt ist und (ii) ein möglicher Zusammenhang zwischen Transkriptionsregulation und RNA-Bindung besteht.

3.3.2 Einfluss der Hexamerisierung und des Zinkfinger-Motivs von VP30 auf die RNA-Bindung

Zwei weitere literaturbekannte VP30-Varianten, die nicht in der Lage sind die Transkription zu unterstützen, betreffen die Hexamerisierungsdomäne sowie das Zinkfinger-Motiv [89,91]. Es konnte gezeigt werden, dass bereits durch Mutation eines Leucins des Tetraleucin-Motivs (aa 100-103) die Hexamerisierung ebenso wie die Transkription inhibiert werden [91]. Hier wurde eine VP30-Variante gewählt, bei der die vier Leucine sowie das darauffolgende Isoleucin zu Alanin mutiert wurden, um eine Hexamerisierung vollständig auszuschließen (VP30_5LA). Desweiteren wurde ein Cystein des Zinkfinger-Motivs zu Serin mutiert (VP30_C72S), da diese Mutante ebenfalls nicht in der Lage ist die Transkription zu unterstützen [89]. Beide Mutanten wurden in einen Expressionsvektor eingebracht, in *E. coli* wie beschrieben exprimiert und aufgereinigt (s. Kap. 2.8.1) und mittels EMSA bezüglich ihres Bindungsverhaltens analysiert. Beide Proteinvarianten zeigten ein stark beeinträchtigtes RNA-Bindungsverhalten, bei dem lediglich bei höheren VP30-Konzentrationen eine basale RNA-Bindung zu beobachten war. Die experimentellen Endpunkte der beiden Proteinvarianten lagen bei 0.08 im Fall von VP30_5LA und bei 0.18 für VP30_C72S.

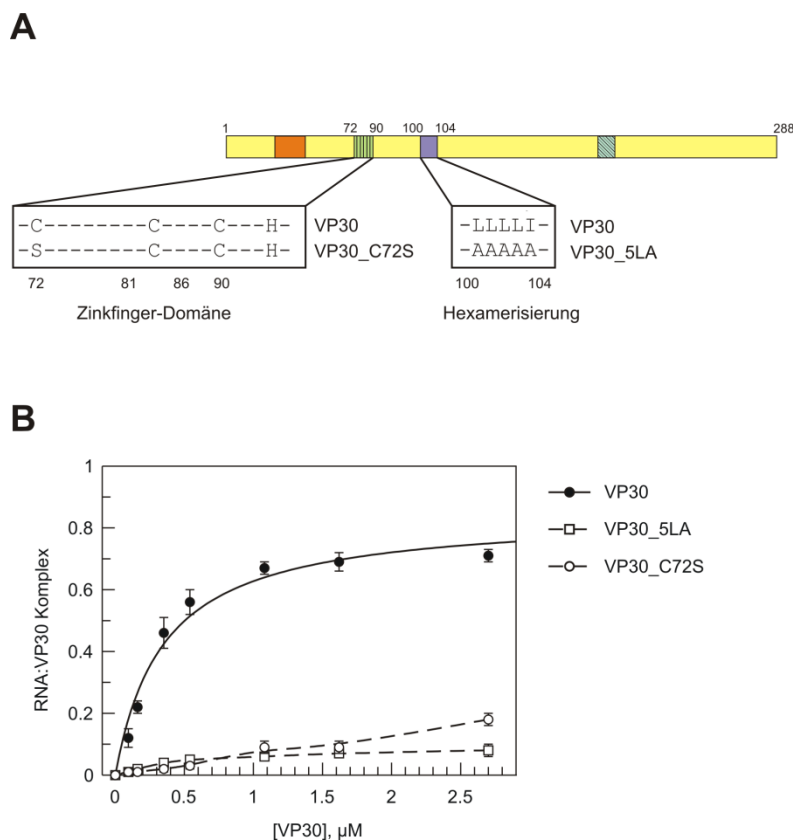


Abb. 40 Einfluss der Hexamerisierungs- und Zinkfinger-Domänen auf die RNA-Bindung. **(A)** Schema der VP30-Varianten VP30_5LA und VP30_C72S. VP30_5LA besitzt einen Hexamerisierungsdefekt aufgrund der Mutation von vier Leucinen und einem Isoleucin zu Alanin; der Austausch eines Cysteins mit Serin (VP30_C72S) führt zum Funktionsverlust der Zinkfinger-Domäne. **(B)** Ergebnis der Bindungsstudien mittels EMSA. Die Komplexe wurden quantifiziert und entsprechende K_d -Werte kalkuliert. Die Experimente wurden bei pH 8.0 durchgeführt (n = 3-5). Sowohl VP30_5LA als auch VP30_C72S zeigten eine stark reduzierte RNA-Bindung.

Die Ergebnisse machten deutlich, dass sowohl die Hexamerisierung als auch eine intakte Zinkfinger-Domäne essenzielle Voraussetzungen für die RNA-Bindung von VP30 sind. Im Fall von VP30_C72S wäre auch ein indirekter Effekt auf die RNA-Bindung und Transkriptionsaktivierung denkbar, der auftreten würde, wenn durch die Mutation eine globale Veränderung in der 3D-Struktur verursacht oder eine funktionale Oligomerisierung (wie z.B. für M2-1 gezeigt, [103]) verhindert werden würde. In beiden Fällen ist eine ausgeprägte Korrelation zwischen RNA-Bindung und transkriptioneller Aktivierung zu erkennen, da beide Domänen für die Aktivierung der Transkription intakt sein müssen [89,91].

3.3.3 Einfluss der C-terminalen Domäne auf die RNA-Bindung

Aufgrund der starken strukturellen Ähnlichkeit und der funktionellen Analogien zwischen M2-1 und der C-terminalen Domäne von VP30 (s. Kap. 1.3.3) stellte sich die Frage, ob diese Domäne trotz fehlender Zinkfinger- und Hexamerisierungsdomäne noch einen Beitrag zur RNA-Bindung leistet, auch vor dem Hintergrund, dass in diesem Bereich kürzlich Aminosäuren identifiziert wurden, die zum Phosphorylierungsstatus von VP30 beitragen [92]. Hierfür wurde eine bereits strukturell aufgeklärte VP30-Variante verwendet, die die C-terminalen Aminosäuren 142-272 beinhaltet (VP30_{CTD}) [107]. Im Gegensatz zu den anderen verwendeten VP30-Varianten zeigte VP30_{CTD} ein sehr gutes Löslichkeitsverhalten, so dass sie in hohen Konzentrationen hergestellt und eingesetzt werden konnte.

Bei der Untersuchung der RNA-Bindung ergab sich, dass in dem bisher untersuchten Konzentrationsbereich (maximal 2.7 μM) keine signifikante Komplexbildung erkennbar war. Die halb-maximale Komplexbildung lag bei $> 30 \mu\text{M}$ und damit nicht mehr in einem für die hier gezeigten Studien relevanten Affinitätsbereich.

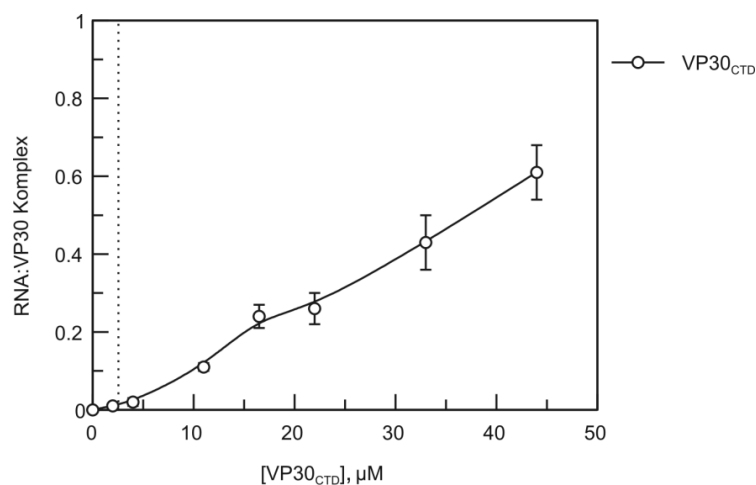


Abb. 41 Quantifizierung der RNA:VP30_{CTD}-Komplexe. Die halb-maximale Sättigung wurde bei einer Konzentration von $> 30 \mu\text{M}$ erreicht. In dem bisher verwendeten Konzentrationsbereich (maximal 2.7 μM ; gestrichelte Linie) konnte eine Komplex-Bildung von ca. 0.02 erreicht werden ($n = 3$), was im Kontext des hier relevanten Affinitätsbereiches als bindungsaktiv einzustufen ist.

Das Ergebnis war ein wichtiger Beitrag zum funktionellen Vergleich von M2-1 und VP30, da es verdeutlicht, dass die beiden Proteine trotz ihrer zahlreichen Analogien mechanistisch unterschiedlich sind. Zudem zeigt das Experiment, dass die für die RNA-Bindung relevanten Regionen und Domänen, die auch im Fokus des hier gezeigten Teilprojektes lagen, sich in der N-terminalen Region bzw. vor Aminosäure 142 befinden (s. Zinkfinger-Motiv, Hexamerisierungsdomäne, Serin- bzw. Arginin-Cluster).

3.3.4 Untersuchung des Arginin-Clusters auf seine Bedeutung für die RNA-Bindung und Transkriptionsaktivierung

Wie bereits erwähnt überlappen im N-terminalen Bereich von VP30 die zwei Phosphorylierungscluster (Serin-Cluster) mit einer Arginin-reichen Region, die bereits mit der RNA-Bindungsaktivität von VP30 in Verbindung gebracht wurde [90]. Deshalb wurde der Einfluss dieser Arginine auf die RNA-Bindungsaktivität ebenfalls mittels EMSA getestet. Dafür wurden drei Einzelmutanten (VP30_R26A, VP30_R28A und VP30_R40A) sowie eine Tripelmutante (VP30_3RA) konstruiert und eingesetzt (s. Abb. 42 A). Hier ist zu erwähnen, dass alle Arginin-Mutanten aufgrund ihres veränderten Komplexbildungsverhaltens (s. Kap. 3.3.5) bei einem niedrigeren pH-Wert (pH 7.5) untersucht wurden als die Wildtyp-Variante von VP30 (pH 8.0). Die experimentelle Durchführung bei pH 7.5 könnte die Affinität zur RNA positiv beeinflusst haben, was möglicherweise die hier detektierten Defekte der Arginin-Mutanten in der RNA-Bindung abgeschwächt haben könnte [90].

Die Analyse der RNA-Bindung mittels EMSA ergab, dass die RNA-Bindungsaffinität der Einzelmutanten nicht (VP30_R28A und VP30_R40A) oder nur geringfügig (VP30_R26A) beeinflusst wurde, allerdings waren die Bindungsplateaus deutlich reduziert. Im Fall der Dreifachmutante VP30_3RA konnte eine Abnahme der Affinität um den Faktor 2 beobachtet werden (s. Abb. 42 B).

Zudem war auffällig, dass eine Bindungskurvenanpassung auf Basis eines Modells mit singulärer Ligandenbindestelle im Fall der Dreifach-Mutante den Bindungscharakter nicht einwandfrei widerspiegeln konnte, während der Bindungsmodus der Einzelmutanten mit diesem Modell abgebildet werden konnte. Deshalb wurde für VP30_3RA alternativ ein kooperativer Bindungsmodus zugrunde gelegt (VP30 lieferte für beide Bindungsmodi zufriedenstellende Kurvenanpassungen). Bei VP30_3RA konnte man deutlich erkennen, dass das kooperative Modell in diesem Fall die Bindungseigenschaften besser widerspiegelt (s. Abb. 42 C). Die Affinität von VP30_3RA ist bei diesem Bindungsmodus um den Faktor 1.7 gegenüber VP30 reduziert.

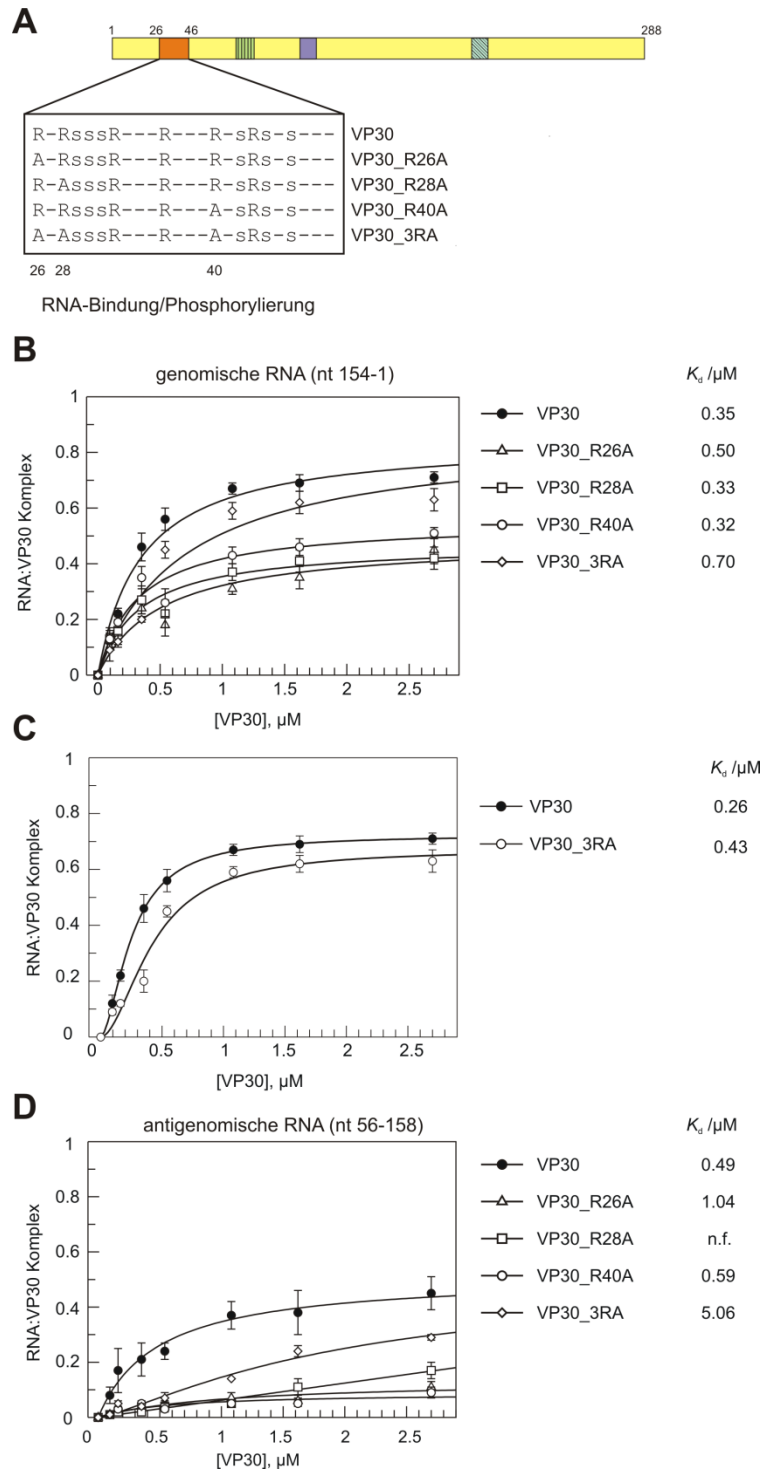


Abb. 42 Einfluss des Arginin-Clusters auf die RNA-Bindung. **(A)** Schema der VP30-Varianten VP30_R26A, VP30_R28A, VP30_R40A sowie VP30_3RA. Die Dreifach-Mutante VP30_3RA enthält simultan die drei Einzelmutationen an den Positionen R26, R28 und R40. **(B)** Ergebnis der Bindungsstudien mittels EMSA. Die Komplexe wurden quantifiziert und entsprechende K_d -Werte auf der Basis eines Modells mit singularer Ligandenbindestelle abgeleitet. Die Experimente wurden für VP30 bei pH 8.0 durchgeführt ($n = 3-5$). Die Arginin-Mutanten wurden bei einem pH von 7.5 vermessen ($n = 3-4$). Während die Einzelmutanten keinen oder nur einen schwachen Affinitätsverlust zeigten, konnte bei der Dreifach-Mutante eine Affinitätsabnahme um den Faktor 2 detektiert werden. **(C)** Kurvenanpassung und K_d -Wert-Bestimmung für VP30 und VP30_3RA auf der Grundlage eines kooperativen Modells mit mehr als einer RNA-Bindungsstelle. Die Affinitäten unterscheiden sich hier um den Faktor 1.7. **(D)** RNA-Bindungskurven für VP30, VP30_R26A, VP30_R28A, VP30_R40A und VP30_3RA unter Verwendung eines antigenomischen RNA-Substrats (nt 56-158). Die entsprechenden K_d -Werte wurde über eine Kurvenanpassung mit singularer Ligandenbindestelle abgeleitet ($n = 3-4$).

In der Studie von John *et al.* [90] wurde im Fall einer R40A-Mutation von VP30 von einer 4-fache Affinitätsreduktion berichtet, die unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen nicht nachvollzogen werden konnte. Da jedoch in der erwähnten Studie ein antigenomisches RNA-Substrat (nt 36-80) verwendet wurde, wurden die Bindungseigenschaften der Arginin-Mutanten zusätzlich mit einem (+) RNA-Substrat untersucht, das den 5'-terminalen Bereich der NP-mRNA repräsentiert (nt 56-158; s. Abb. 42 D). Im Vergleich zum Wildtyp-Protein zeigten die Arginin-Mutanten erneut eine beeinträchtigte RNA-Bindung, was vor allem in einem stark herabgesetzten experimentellen Endpunkte resultierte. Mit beiden RNA-Substraten konnte für die Tripel-Mutante (VP30_3RA) ein höherer Endpunkt erreicht werden als mit den Einzelmutanten.

Die hier vorgestellten Daten deuten auf ein komplexes Zusammenspiel des Arginin-Clusters mit der RNA-Bindung hin, das sich in den ermittelten K_d -Werten, den experimentellen Endpunkten oder einem veränderten Bindungsmodus zeigte (s. Abb. 42; s. Zusammenfassung und Diskussion).

Die Arginin-reiche Region wurde bisher nicht auf ihre Rolle in der Aktivierung der Transkription untersucht, weshalb auf Basis von trVLPs der Einfluss der Einzel- und Tripel-Mutationen auf die Transkription überprüft werden sollte (Experimente durchgeführt von Dr. Nadine Biedenkopf, AG Becker). Bisher wurde die Transkriptionsaktivierung hauptsächlich über die Chloramphenicol-Acetyltransferase-Aktivität (CAT) als Reportergen bestimmt [86,89,91], in aktuelleren Studien wurde diese allerdings durch die Verwendung von Luziferase ersetzt [88].

Im Gegensatz zu den bisher veröffentlichten Luziferase-basierten Transkriptionsaktivierungs-Daten, wurde in dieser Studie zwischen Synthese- und Indikator-Zellen unterschieden. Die Synthese-Zellen spiegeln den Status einer späten viralen Infektion wider, in denen aufgrund der hohen Menge an viralen Proteinen und Minigenom sekundäre Transkription und Replikation stattfinden können. Aus diesen Zellen werden authentisch verpackte virale Partikel ausgeschleust und können anschließend für die Infektion neuer Zellen (= Indikator-Zellen) verwendet werden (s. Abb. 43 A). Diese repräsentieren die Phase der primären Transkription, da hier keine viralen Proteine mehr synthetisiert werden können und damit sehr limitiert vorliegen. Für beide Zelltypen wird das Maß der Transkription über die Aktivität und damit der Expression der Luziferase bestimmt.

Aus dem Vergleich von VP30_wt mit den verschiedenen Arginin-Mutanten ging klar hervor, dass die Einzelmutanten (VP30_R26A, VP30_R28A und VP30_R40A) keinen signifikanten Effekt auf die Transkription weder in den Synthese- noch in den Indikator-Zellen hatten, was im Einklang mit den Ergebnissen der RNA-Bindungsstudien steht (s. Abb. 42 B und Abb. 43 B links). Bei der Dreifach-Mutante hingegen, konnte in den Synthese-Zellen ein schwacher,

aber dennoch signifikanter Effekt auf die Transkription detektiert werden, der sich in den Indikatorzellen verstärkte und zu einem prägnanten Transkriptionsdefekt führte.

Um auszuschließen, dass der beobachtete Effekt von VP30_3RA auf fehlendes VP30 in den Viruspartikeln (und damit auch in den Indikator-Zellen) zurückzuführen war, wurden die Viruspartikel vor und nach Proteinase K-Verdau auf die Anwesenheit von VP30 überprüft. Ist VP30 in die Viruspartikel inkorporiert, kann es nicht durch Proteinase K abgebaut werden. Hierbei zeigte keine der verwendeten Mutanten einen im Vergleich zum Wildtyp-Protein veränderten Einbau in die Viruspartikel (s. Abb. 43 B rechts). Das Ergebnis ließ den Schluss zu, dass (i) Effekte der eingeführten Mutationen direkt die Transkription betrafen und (ii) die Mutationen die Inkorporation in Viruspartikel und damit die Interaktion von VP30 mit NP nicht negativ beeinflussten.

Die Ergebnisse dokumentierten eine direkte Rolle des Arginin-Clusters in der Transkriptionsaktivierung durch VP30. Damit unterscheidet sich VP30_3RA stark von VP30_DD: obwohl beide VP30-Varianten in der RNA-Bindungsaffinität einen ähnlich negativen Effekt hervorriefen, zeigte VP30_DD schon in den Synthese-Zellen nahezu keine Transkriptionsaktivierung mehr, was im Fall von VP30_3RA erst in den Indikator-Zellen beobachtet werden konnte (s. Zusammenfassung und Diskussion).

Im Minigenom-System kann nicht eindeutig zwischen Effekten auf Transkriptions- und Replikationsebene unterschieden werden v.a. vor dem Hintergrund, dass eine verstärkte Replikation zu einer höheren Anzahl an Templaten für die Transkription führt. Um dies zu adressieren, wurde die replizierte virale RNA mittels RT-qPCR spezifisch quantifiziert (Experimente durchgeführt von Dr. Nadine Biedenkopf, AG Becker; s. Abb. 44). Wie bereits aus der Literatur bekannt, begünstigt die Abwesenheit von VP30 den replikativen Modus, was zu einem höheren Anteil an replizierter RNA-Spezies führt [88]. Interessanterweise führten alle VP30-Arginin-Mutanten zu einer Erhöhung an Replikationsprodukten (= vRNA), vergleichbar mit dem Level, das in Abwesenheit von VP30 ermittelt wurde. Dies bedeutet, dass der für VP30_3RA beobachtete Defekt in der Transkriptionsaktivierung nicht auf einen Defekt in der Replikation zurückzuführen ist.

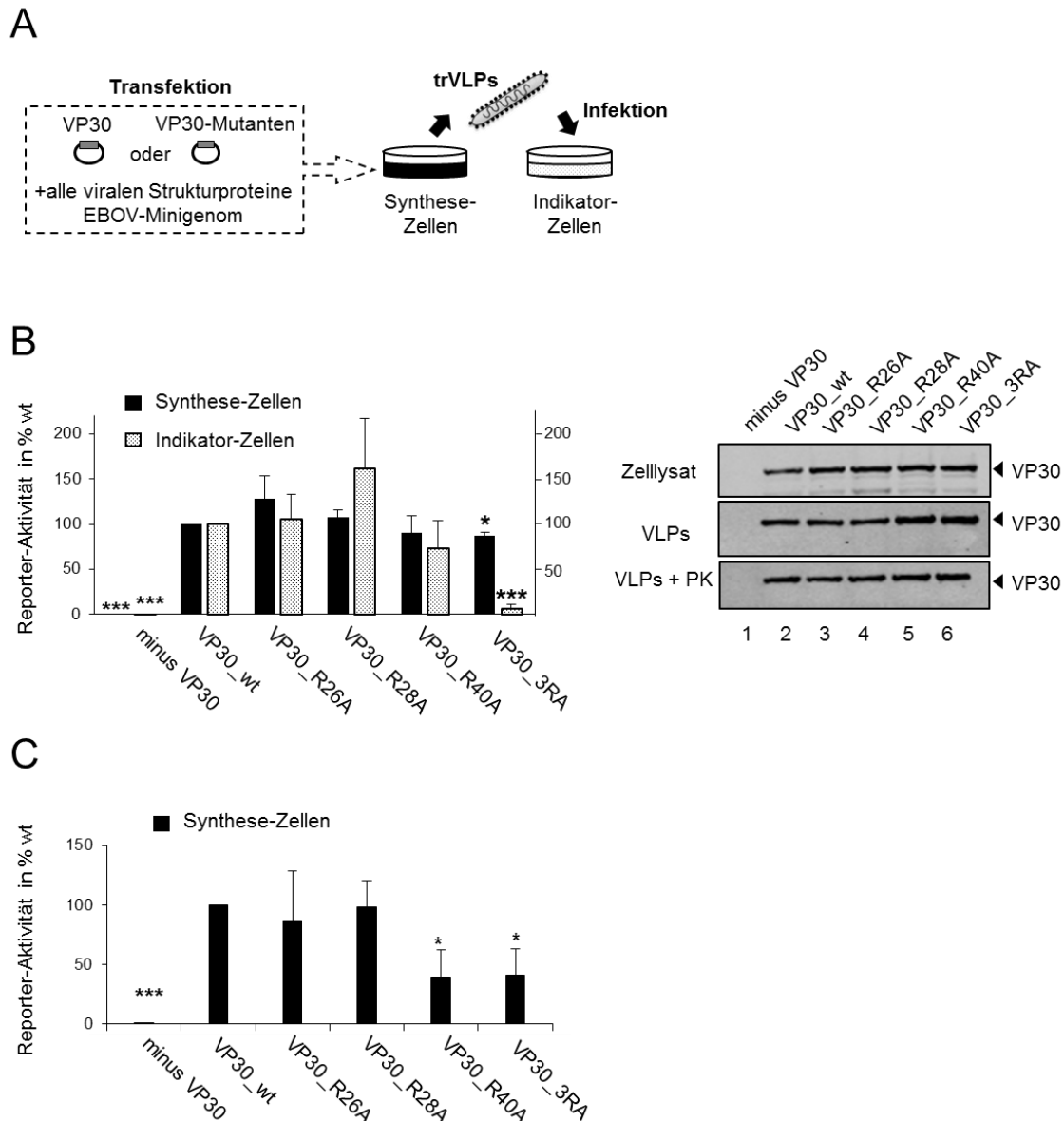


Abb. 43 Ergebnisse des trVLP-Assays zur Untersuchung der Transkriptionsaktivierung. **(A)** Schema des Versuchsaufbaus. Plasmid-kodierte virale Proteine (VP30_wt oder VP30-Mutanten) werden in Zellen transfiziert, in denen virale Transkription und Replikation stattfinden können (= Synthese-Zellen). Die hier stattfindende detektierbare Transkription reflektiert die Phase einer späten Infektion. In diesen Zellen werden virale Partikel hergestellt und ausgeschleust. Die trVLPs können wiederum neue Zellen infizieren (= Indikator-Zellen), in denen nur eine primäre Transkription auf Basis der VLP-assoziierten Proteine stattfindet. **(B)** Ergebnis des trVLP-Assays. Links: schwarze Balken zeigen die Transkriptionsaktivität in Synthese-Zellen, graue Balken in Indikator-Zellen; während die Einzelmутanten (VP30_R26A, VP30_R28A, VP30_R40A) keine signifikanten Effekte zeigten, konnte bei der Tripel-Mutante (VP30_3RA) ein schwacher Effekt in den Synthese-Zellen und ein stark ausgeprägter Effekt in den Indikator-Zellen festgestellt werden. Rechts: Western Blot-Experiment zum Nachweis von VP30 in den trVLPs vor und nach Behandlung mit Proteinase K. Sowohl Wildtyp-VP30 als auch alle verwendeten Mutanten werden gleichermaßen in Viruspartikel verpackt. **(C)** Ergebnis des trVLP-Assays unter Verwendung eines Replikations-defekten Minigenoms; während VP30_R26A und VP30_R28A keine signifikante Veränderung zum Wildtyp-Protein zeigten, wurde in den Varianten VP30_R40A und VP30_3RA eine Beeinträchtigung der Transkriptionsaktivierung beobachtet [Abbildung von Dr. Nadine Biedenkopf, AG Becker].

Um dieses Ergebnis weiter zu bekräftigen, wurde VP30 im Vergleich zu den verschiedenen Arginin-Mutationsvarianten in einem replikations-defekten Minigenom-System getestet [88]. Dieses Minigenom wurde am 5'-trailer um etwa 50 Nukleotide verkürzt, was eine Replikation des viralen Genoms unterbindet, so dass beobachtete Effekte auf den Vorgang der

Transkription konkretisiert werden können. Unter diesen Bedingungen konnte sogar schon in den Synthese-Zellen ein prägnanter Effekt von VP30_3RA auf die Transkriptionsaktivierung festgestellt werden. Zusätzlich konnte auch für VP30_R40A eine stark beeinträchtigte Transkriptionsaktivierung dokumentiert werden (s. Abb. 43 C).

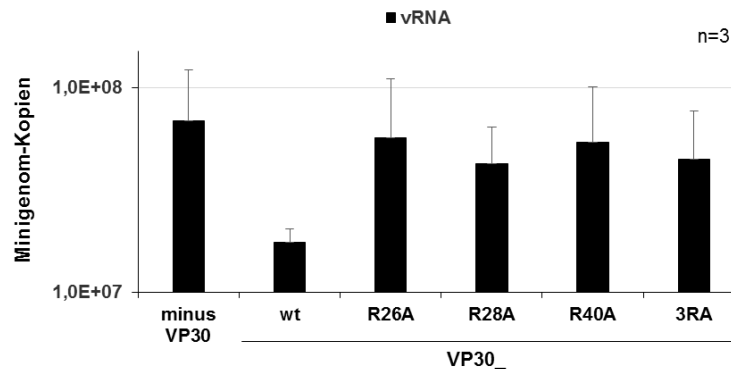


Abb. 44 Spezifische Quantifizierung der replikativen Minigenom-RNA mittels qPCR. In Abwesenheit von VP30 wird verstärkt repliziert, was durch eine Zunahme dieser RNA-Spezies (= vRNA) ersichtlich wird; bei Verwendung des Wildtyp-Proteins (wt) ist die Produktion von vRNA stark vermindert; interessanterweise zeigten alle verwendeten VP30-Arginin-Mutanten ein vRNA-Level, das vergleichbar mit der Abwesenheit von VP30 ist [Abbildung von Dr. Nadine Biedenkopf, AG Becker].

3.3.5 Bildung verschiedener RNA:VP30-Komplexe

Bei der Durchführung der EMSA-Experimente fiel auf, dass neben den RNA:VP30-Komplexen, die in das Gel einliefen (genannt C_1), eine zweite Komplexpopulation entstand, die in der Geltasche verblieb (genannt C_{HMW} ; s. Abb. 23). Die Beobachtung höhermolekularer VP30:RNA-Komplexe ist nicht überraschend, da die Neigung von VP30 zur Bildung oligomerer Strukturen bereits in der Literatur beschrieben wurde [90]. Bei der Quantifizierung der Komplexe wurde dieser zweite Komplex berücksichtigt (siehe auch Kap. 3.2.4). Interessanterweise war das Verhältnis von C_1 - und C_{HMW} -Komplexen von der jeweils verwendeten VP30-Variante als auch vom pH-Wert abhängig.

So zeigte sich beim Vergleich von VP30, VP30_AA und VP30_DD, dass bei letzterem Protein der C_{HMW} -Anteil erhöht und der C_1 -Anteil erniedrigt war (s. Abb. 45 A und Tab. 42). Grund hierfür ist wahrscheinlich der durch die Mutationen veränderte isoelektrische Punkt (pI) von VP30_DD, der von 9.0 auf 7.2 herabgesetzt war und somit eine stark veränderte Oberflächenladung reflektiert.

Bei den Einzel-Arginin-Mutanten konnte man kein verändertes Komplexbildungsverhalten erkennen, während die Tripel-Arginin-Mutante ähnlich wie VP30_DD eine erhöhte C_{HMW} -Bildung aufwies (s. Abb. 45 B). Auch hier war der pI aufgrund der Mutation von drei Argininen zu Alaninen deutlich verändert. Im Vergleich zu den übrigen VP30-Mutanten wurde der pH-Wert der Aufreinigung und des EMSA für die VP30-Arginin-Mutanten von 8.0 auf 7.5 herabgesetzt.

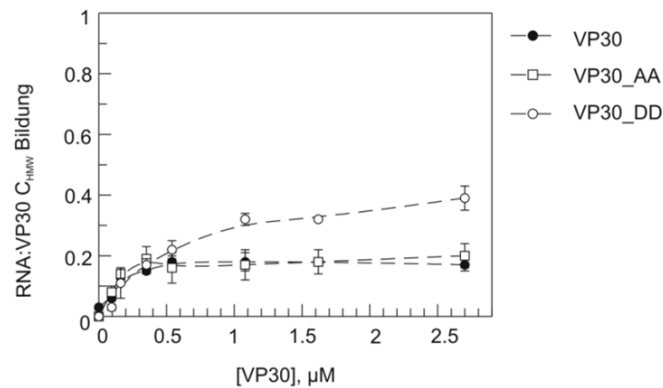
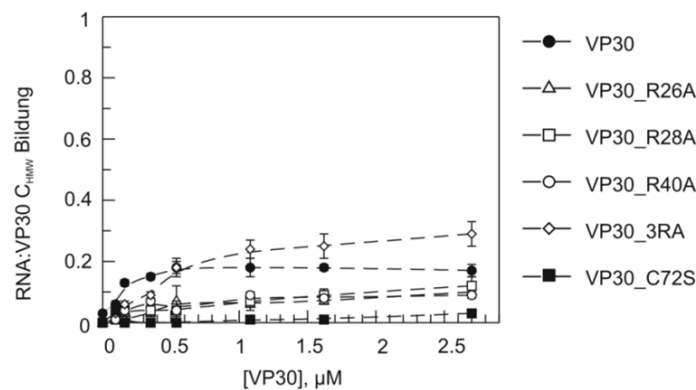
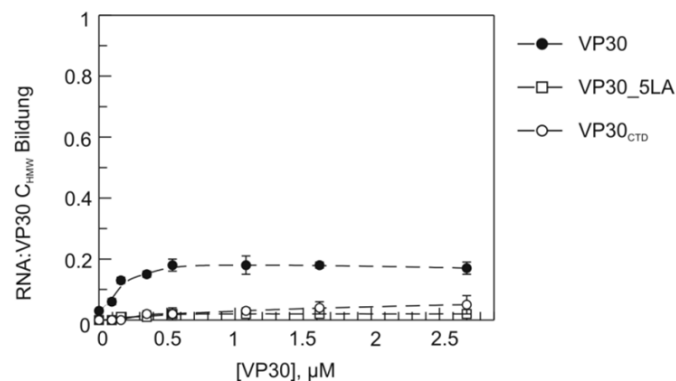
A**B****C**

Abb. 45 Quantifizierung der höhermolekularen RNA:VP30-Komplexe (C_{HMW}-Komplexe). (A) C_{HMW}-Bildung von VP30 in Vergleich zu VP30_AA und VP30_DD. VP30_DD zeigte eine erhöhte Tendenz zur Bildung von C_{HMW}-Komplexen, was wahrscheinlich auf seinen stark veränderten pI zurückzuführen ist. (B) Während die Komplexbildung der Einzel-Arginin-Mutanten vergleichbar mit VP30 war, tendierte VP30_3RA zu einer erhöhten C_{HMW}-Bildung, was wiederum mit dem starken Eingriff in die Ladungsverteilung durch die eingeführten Mutationen korrelierte. VP30_C72S zeigte keine höheren RNA:VP30-Komplexe. (C) VP30_5LA und VP30_{CTD} zeigten keine signifikante C_{HMW}-Komplexbildung.

Das vor allem bei VP30_3RA stark pH-Wert-abhängige Komplexbildungsverhalten zeigt der Vergleich der bei pH 8.0 und pH 7.5 durchgeführten Aufreinigungs- und EMSA-Prozedur (s. Abb. 46). Hier war deutlich zu erkennen, dass bei pH 8.0 die Bildung von C_{HMW}-Komplexen stark bevorzugt war, während bei pH 7.5 die Bildung von C₁-Komplexen in einem zu den anderen VP30-Varianten vergleichbaren Ausmaß beobachtet wurde.

Sowohl VP30_5LA als auch VP30_{CTD} zeigten keinerlei Bildung von höheren Oligomeren, was mit ihrem allgemeinen Verlust der RNA-Bindungsaktivität im Einklang steht (s. Abb. 45 C).

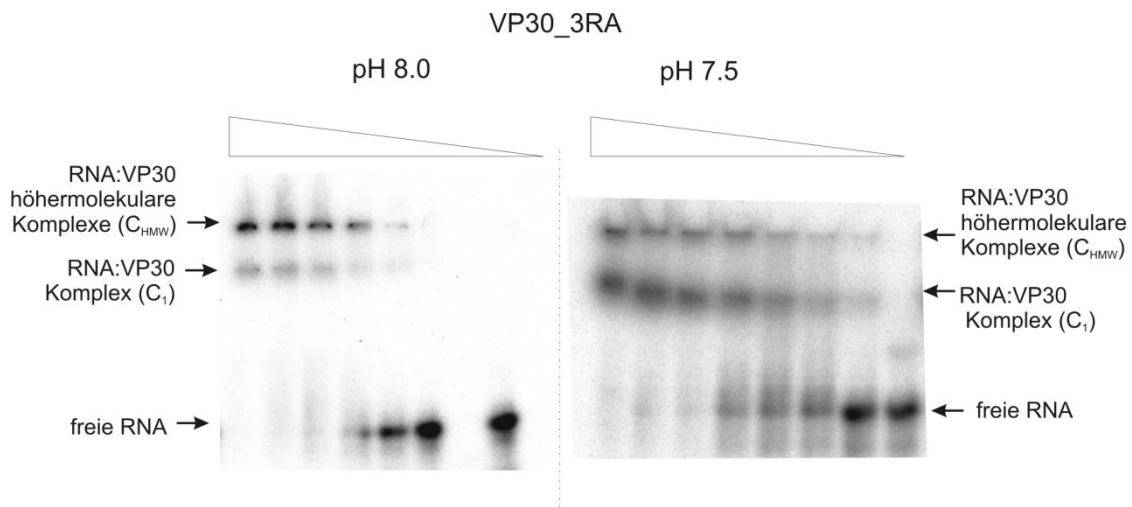


Abb. 46 Effekt des pH-Wertes auf die RNA:VP30-Komplexbildung. Das Komplex-Gleichgewicht von VP30_3RA war bei pH 8.0 stark in Richtung höhermolekularer Komplexe verschoben (links). Der Anteil von C₁ konnte durch Herabsetzen des pH-Wertes auf 7.5 wieder auf ein Niveau erhöht werden, das etwa dem von VP30 entsprach (rechts).

Die hier vorgestellten Beobachtungen bezüglich des Komplexbildungsverhaltens von VP30 deuteten auf Oligomerisierungsverhalten und -gleichgewicht des Proteins hin, das sensibel auf Veränderungen des pH-Wertes und der Oberflächenladung reagiert.

3.3.6 Einfluss von RNA auf die Interaktion von VP30 und VP35 und deren Homo-Oligomerisierung

Erst kürzlich konnte eine Interaktion zwischen VP30 und VP35 nachgewiesen werden, die abhängig vom Phosphorylierungszustand von VP30 ist. Dephosphoryliertes VP30 interagiert mit VP35 als Voraussetzung für die Bildung des Transkriptionskomplexes. Ist VP30 phosphoryliert, kann es nicht mehr mit VP35 interagieren, sondern bildet präferenziell einen Komplex mit NP [88].

Im Hinblick auf die RNA-Bindung von VP30 stellte sich die Frage, ob die Interaktion zwischen VP30 und VP35 RNA-abhängig ist. Dies wurde mit Hilfe von Coimmunopräzipitations-Experimenten überprüft, bei denen die Proben mit RNasen behandelt wurden (Experimente durchgeführt von Dr. Nadine Biedenkopf, AG Becker). Die Ergebnisse zeigten, dass die Interaktion zwischen VP30 und VP35 abhängig von der Anwesenheit von RNA ist (s. Abb. 47 A).

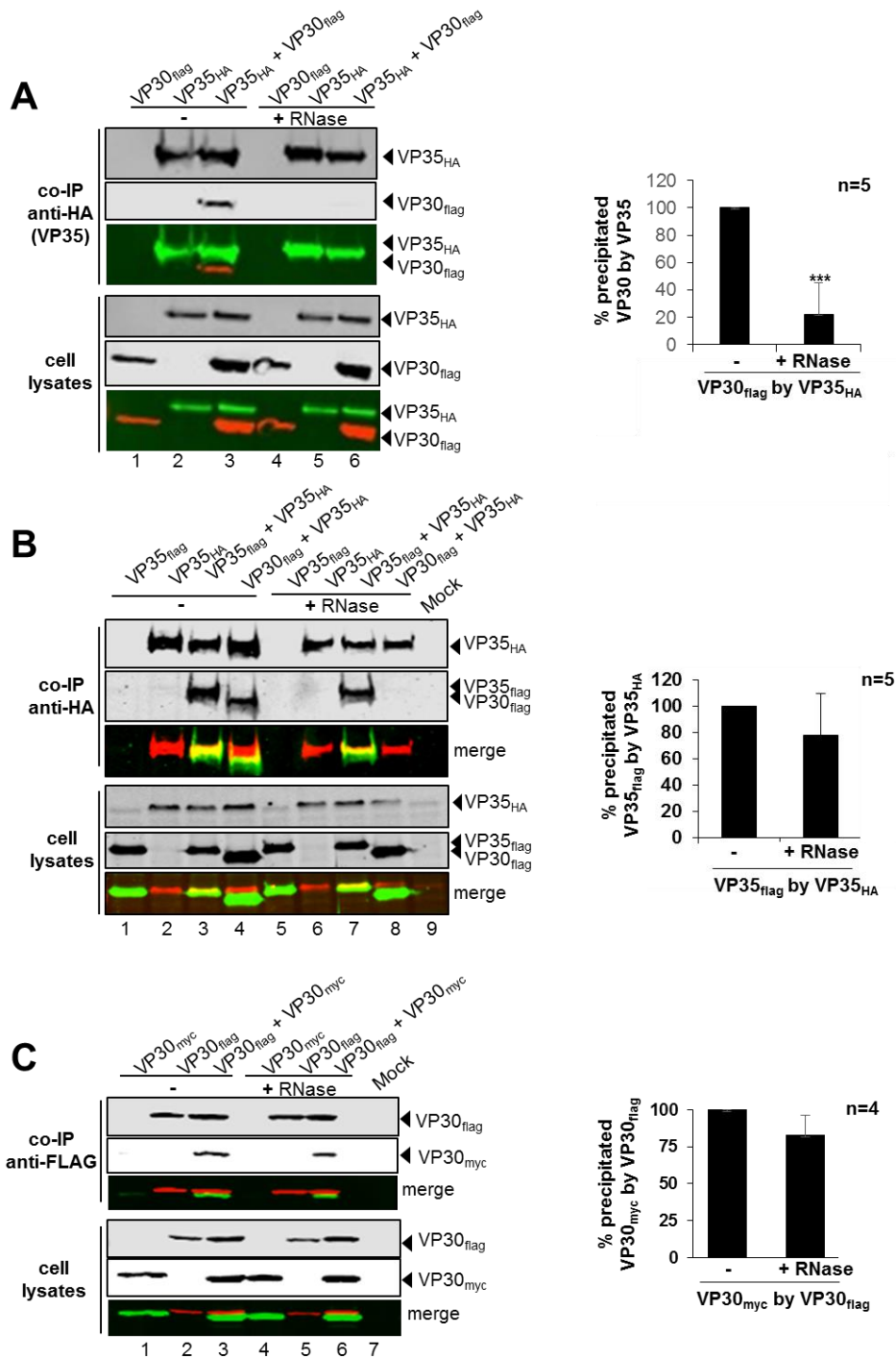


Abb. 47 Coimmunopräzipitations-Experimente mit VP30 und VP35. **(A)** Die Komplexbildung zwischen VP30 und VP35 ist abhängig von der Anwesenheit von RNA, da nach Behandlung mit RNase nur noch eine stark reduzierte Coimmunopräzipitation nachgewiesen werden konnte (links Spur 3 vs. Spur 6); Quantifizierung des präzipitierten VP30 mit und ohne RNase-Behandlung (rechts). **(B)** Die Homo-Oligomerisierung von VP35 wurde durch die Behandlung mit RNase nicht signifikant beeinflusst (vgl. Spur 3 und Spur 7 links und Quantifizierung rechts). **(C)** VP30 ist unabhängig von der Anwesenheit von RNA in der Lage zu oligomerisieren, da die Zugabe von RNase keinen Unterschied in der Copräzipitation von Flag- und Myc-getaggt VP30 hervorruft (vgl. Spur 3 und Spur 6 links; siehe Quantifizierung rechts); [Abbildung von Dr. Nadine Biedenkopf, AG Becker].

Sowohl VP35 als auch VP30 bilden Oligomere. Während VP35 hauptsächlich als Trimer vorliegt [123], ist die funktionale Form von VP30 ein Hexamer [91]. Durch weitere

Coimmunopräzipitations-Experimente sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Homo-Oligomerisierung durch die An- bzw. Abwesenheit von RNA beeinflusst wird. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl die Homo-Oligomerisierung von VP35 also auch die von VP30 RNA-unabhängig stattfindet (s. Abb. 47 B und C).

3.3.7 Zusammenfassung und Diskussion

Ziel des Projekts war es den vermuteten Zusammenhang zwischen der RNA-Bindung von VP30 und dessen Funktion als Transkriptionsfaktor zu untersuchen und damit die RNA-Bindungsaktivität von VP30 erstmals in einen physiologischen Kontext zu stellen.

Dabei wurden alle literaturbekannten VP30-Varianten, die Einfluss auf die Transkription besitzen, rekombinant als MBP-Fusionsproteine hergestellt und mittels EMSA und einer genomischen viralen RNA auf ihre RNA-Bindungsfähigkeit untersucht (s. Tab. 42).

Tab. 42 Ergebnisübersicht der Bindungsstudien mit den verschiedenen VP30-Varianten. Die angegebenen K_d -Werte wurden durch Kurvenanpassung an ein Bindungsmodell mit singulärer RNA-Bindestelle bestimmt; n.f. = kein Fitting möglich; EP C_1 = Experimenteller Endpunkt der C_1 -Komplexe; EP C_{HMW} = Experimenteller Endpunkt der C_{HMW} -Komplexe; pI (Fusion) zeigt die kalkulierten isoelektrischen Punkte für die MBP-VP30-Varianten, während pI (VP30) die isoelektrischen Punkte für die jeweilige VP30-Variante nach Abspaltung des MBP-tag darstellt (kalkuliert mit *ProtParam*). Die Proteinpräparationen und K_d -Wert-Bestimmungen erfolgten bei pH 8.0 (VP30, VP30_AA, VP30_DD, VP30_5LA und VP30_C72S) bzw. pH 7.5 (VP30_R26A, VP30_R28A, VP30_R40A, VP30_3RA).

Protein	K_d / μ M	EP C_1	EP C_{HMW}	pI (Fusion)	pI (VP30)
VP30	0.35 ± 0.07	0.71	0.16	6.6	9.0
VP30_AA	0.17 ± 0.03	0.66	0.20	6.6	9.0
VP30_DD	0.73 ± 0.16	0.47	0.39	6.0	7.2
VP30_5LA	max. 8% Bindung	0.08	0.02	6.6	9.0
VP30_R26A	0.50 ± 0.17	0.45	0.21	6.4	8.8
VP30_R28A	0.33 ± 0.09	0.42	0.20	6.4	8.8
VP30_R40A	0.32 ± 0.09	0.51	0.23	6.4	8.8
VP30_3RA	0.70 ± 0.22	0.63	0.29	6.3	8.4
VP30_C72S	max. 18% Bindung	0.18	0.03	6.6	9.1

Die Hexamerisierungs-defekten VP30-Varianten sowie VP30-Varianten mit mutiertem Zinkfinger-Motiv wurden bereits als transkriptionsinaktiv identifiziert [89,91]. In den hier gezeigten RNA-Bindungsstudien konnte nachgewiesen werden, dass diese Varianten nicht mehr in der Lage sind RNA zu binden und damit beide Domänen direkt oder indirekt sowohl für die RNA-Bindung als auch für die Transkriptionsaktivität essenziell sind.

Eine weitere Korrelation mit bestehenden Daten zur Transkriptionsaktivierung konnte bei den Phosphorylierungs-Mutanten beobachtet werden. Während bei VP30_DD die Transkriptionsaktivierung um ca. 2.5-5-fach reduziert ist [87,88], ist auch die Fähigkeit RNA zu binden im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 2.1 bzw. im Vergleich zu VP30_AA um den Faktor 4.3 reduziert (s. Tab. 42).

Die Untersuchung der Arginin-Mutanten ergab, dass diese ebenfalls in die RNA-Bindung involviert sind und zu einer gesteigerten Replikation führen. Während die Einzelmutationen (VP30_R26A, _R28A und _R40A) keinen signifikanten Effekt auf die RNA-Bindungsaffinität zeigten, so wurde jedoch ein stark verminderter experimenteller Endpunkt beobachtet. Die simultane Mutation von drei Argininen (VP30_3RA) führte zur Reduktion der Bindungsaffinität um den Faktor 2 und einem Wechsel zu einer eher kooperativ geprägten Bindung. Zusätzlich wurde im Fall der Tripel-Mutante ein drastischer Effekt auf die primäre Transkription (= Indikator-Zellen) nachgewiesen.

Auch in der Studie von John *et al.* wurden bereits VP30-Varianten mit Mutationen im Arginin-Cluster auf ihre RNA-Bindungsfähigkeit mittels Filterbindungs-Assay untersucht (verwendete RNA: Antigenom nt 36-80; [90]). Hierbei wurde die Affinität des Wildtyp-Proteins mit 61 nM bestimmt und lag damit wahrscheinlich aufgrund zahlreicher Unterschiede in den experimentellen Bedingungen (verwendete VP30-Konstrukte, Aufreinigungsprotokolle, RNA-Bindungspartner sowie Bindungsassay) um den Faktor 5.7 niedriger als in den hier vorgestellten Daten. Arginin-zu-Alanin-Substitutionen wurden bei John *et al.* an den Positionen R28, R32, R36 und R40 eingeführt, wobei für die Mutation R40A eine Abnahme der Affinität (K_d (VP30_R40A): 255 nM) um den Faktor 4.2 im Vergleich zum Wildtyp beobachtet wurde. Dies konnte in den hier vorgestellten Daten zur RNA-Bindungsaktivität nicht bestätigt werden, da hier keine der Einzelmutationen einen signifikanten Effekt auf die RNA-Bindungsaffinität ausübte. Da sowohl im Fall von VP30_3RA als auch bei VP30_DD die Ladungsverteilung in dieser Region zu Ungunsten einer RNA-Bindung verändert wurde und beide Mutanten einen ähnlichen Effekt auf die RNA-Bindungsaffinität zeigten, erscheint es plausibel, dass Einzelmutationen (z.B. VP30_R40A) einen geringeren Effekt auf die RNA-Bindung ausüben als eine Dreifach-Mutation (VP30_3RA). Zusätzlich scheint der RNA:VP30-Bindungscharakter stark von elektrostatischen Wechselwirkungen geprägt zu sein (s. Kap. 3.2.3), was die Annahme unterstützen könnte, dass die Wegnahme einer einzelnen von mehreren positiven Ladungen (VP30_R40A) keinen starken RNA-Bindungsdefekt verursacht, die Arginine also eine funktionale Redundanz (zumindest bezüglich ihres Einflusses auf die RNA-Bindungsfähigkeit von VP30) besitzen.

Interessanterweise zeigte VP30_R40A jedoch einen starken Defekt bei der Transkriptionsaktivierung (ähnlich wie VP30_3RA), wenn ein replikations-defektes

Minigenom-System verwendet wurde. Dies könnte ein Hinweis auf eine Schlüsselrolle dieses Arginins in der Transkriptionsregulation sein.

Während in den bisher publizierten Daten (betreffend VP30_AA, VP30_DD, VP30_5LA und VP30_C72S) die Effekte auf die Transkription bereits in den Synthese-Zellen nachweisbar waren, scheint der Einfluss des Arginin-Clusters komplexer zu sein. Vor allem ist hier ein Vergleich zwischen VP30_DD und VP30_3RA interessant, die sich trotz ihrer ähnlichen Bindungsaffinitäten massiv bezüglich ihrer Fähigkeit die Transkription zu aktivieren unterscheiden: während VP30_DD weder im Wildtyp-Minigenom noch im replikations-defekten Minigenom in der Lage ist die Transkription zu stimulieren, ist VP30_3RA unter identischen Bedingungen noch zur Transkriptionsaktivierung fähig (v.a. bei Betrachtung des Wildtyp-Minigenoms). Eine mögliche Erklärung wäre hierbei, dass die Phosphorylierung in eine Vielzahl der Funktionen von VP30 involviert ist. Ist VP30 phosphoryliert geht es bevorzugt eine RNA-unabhängige Interaktion mit NP ein und steht somit nicht mehr dem Polymerase-Komplex zur Verfügung. Diese Konsequenz der Phosphorylierung könnte ein Grund für den vergleichsweise drastischen Defekt in der Transkriptionsaktivierung sein.

Auch für M2-1, den essenziellen Transkriptionsfaktor des RSV, wurde ein Zusammenhang zwischen RNA-Bindung und Transkriptionsaktivierung gezeigt [103]. Bei dem Austausch von zwei Argininen zu Alaninen (M2-1_R3AR4A) wurde die RNA-Bindungsaffinität um ca. Faktor 2 reduziert und die Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung auf ca. 20% reduziert. Ähnliche Effekte wurden bei der hier verwendeten VP30_3RA-Variante gezeigt, bei der sich die RNA-Bindung um den Faktor 2 verminderte und unter Verwendung des replikations-defekten Minigenoms die Transkriptionsaktivierung auf ca. 30% reduziert wurde. Dies könnte auf funktionelle Ähnlichkeiten zwischen diesen beiden Proteinen hindeuten.

Allerdings sind auch einige mechanistische Unterschiede zum Ebolavirus-System hervorzuheben: (i) bei der Verwendung von Phosphorylierungs- bzw. Dephosphorylierungsmutanten von M2-1 wurde in beiden Fällen eine Verminderung der Transkription gezeigt, bei VP30 verhalten sich diese Varianten unterschiedlich, da die Dephosphorylierungsmutante (VP30_AA) die Transkription sehr effizient aktiviert und nur die phosphorylierte Variante (VP30_DD) transkriptionsinaktiv ist; (ii) während sich bei VP30 RNA- und VP35-Bindung gegenseitig ergänzen, konkurrieren diese beiden Interaktionen bei M2-1 miteinander [106].

Die Bildung des Transkriptionskomplexes, bestehend aus VP30, VP35 und L, ist Voraussetzung für eine effiziente mRNA-Synthese. Der Nachweis, dass die Interaktion zwischen VP30 und VP35 RNA-abhängig stattfindet (s. Abb. 47) war ein weiterer Hinweis auf

die wichtige Rolle der RNA-Bindung bei der Transkription. Um welche RNA-Spezies es sich dabei genau handelt, wird Gegenstand zukünftiger Projekte sein.

Auf Basis der hier vorgestellten Daten konnte das Modell der Transkriptionsregulation von VP30 um die Komponente der RNA-Bindung an das virale Templat ergänzt werden (s. Abb. 48). Nach diesem Modell ist VP30 im dephosphorylierten Zustand in der Lage an die genomische RNA (als Templat für die Transkription) zu binden und eine RNA-abhängige Interaktion mit dem Polymerase-Komplex (L und VP35) einzugehen. VP30 erhöht dabei die Affinität des Transkriptionskomplexes zur Templat-RNA, so dass das Reaktionsgleichgewicht stark auf der Seite einer produktiven Transkriptionsinitiation und damit mRNA-Synthese in Anwesenheit von Sekundärstrukturen auf Templatebene und/oder 5'-Ende der Transkripte liegt. Wird VP30 phosphoryliert oder liegt es als Monomer vor, so wird seine Affinität zur RNA und damit seine Assoziation zum Transkriptionskomplex stark vermindert. Die Polymerase L und VP35 allein sind nicht in der Lage die Transkription produktiv zu initiieren, möglicherweise aufgrund der Bildung von Sekundärstrukturen auf Templatebene, die entweder zu einer konformativen Blockierung von L oder zu einer Termination der Transkription und anschließender Dissoziation des Enzyms vom Templat führen.

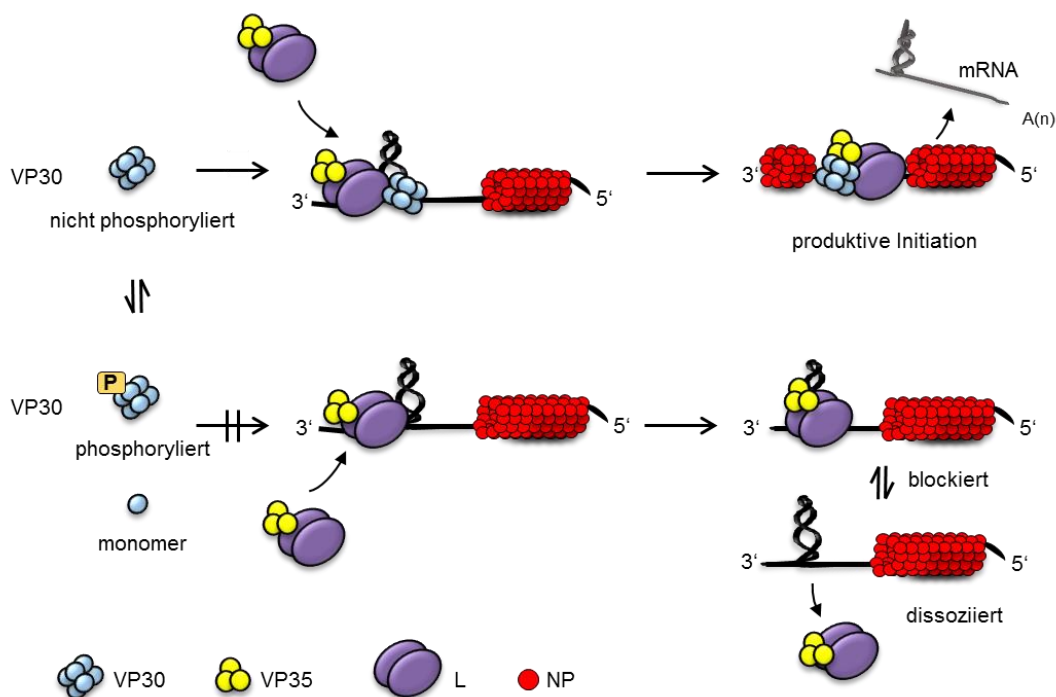


Abb. 48 Erweitertes Modell der Transkriptionsregulation von VP30. VP30 (blau) ist im dephosphorylierten Zustand in der Lage an die genomische RNA (als Templat für die Transkription) zu binden und eine RNA-abhängige Interaktion mit VP35 (gelb) und der Polymerase L (lila) einzugehen. VP30 erhöht die Affinität des Transkriptionskomplexes an das Templat (schwarz), so dass das Reaktionsgleichgewicht stark auf der Seite einer produktiven Initiation und damit mRNA-Synthese liegt. Wird VP30 phosphoryliert oder liegt es als Monomer vor, ist es aufgrund der reduzierten Affinität zur RNA nicht mehr Teil des Transkriptionskomplexes. Die Polymerase L und VP35 neigen deshalb dazu zu blockieren (evtl. an der stabilen Haarnadelstruktur), die Affinität zum Templat zu verlieren und damit schließlich zu dissoziieren. In diesem Fall findet keine effiziente Transkription mehr statt.

Ausgehend von den hier vorgestellten Daten kann eine Bindung an die virale mRNA nicht ausgeschlossen werden, v.a. vor dem Hintergrund der Enkapsidierung des viralen Genoms. Dennoch wurde in dem gezeigten Modell von einer Bindung an die genomische RNA ausgegangen, da keine präferenzielle Bindung an antigenomische RNA festgestellt werden konnte und die RNA-abhängige Interaktion von VP30 mit VP35 als Teil des Transkriptionskomplexes eine Bindung an die Templat-RNA nahelegt.

Die Ergebnisse, die in diesem Teilprojekt gewonnen wurden, zeigten einen deutlichen Zusammenhang zwischen der transkriptionellen Regulation durch VP30 und seiner Fähigkeit RNA zu binden. Erstmals wurde somit die RNA-Bindungsaktivität von VP30 in einen physiologischen Kontext gestellt, was zu einem besseren Verständnis der transkriptionellen Regulation durch VP30 beigetragen hat.

3.4 Transkriptomanalyse zum Verständnis der transkriptionellen Regulation durch VP30

Obwohl bereits viele Studien zur transkriptionellen Regulation von VP30 durchgeführt wurden, die den Phosphorylierungsstatus des Proteins mit dessen Funktion als Transkriptionsfaktor in Verbindung brachten [86,87,88], ist der genaue Mechanismus auf molekularer Ebene bisher unverstanden. Vor allem der Zusammenhang zwischen den postulierten Haarnadelstrukturen am 5'-Ende der viralen mRNAs und der Regulation von VP30 wurde bisher nicht detailliert untersucht. Es konnte zwar gezeigt werden, dass die Haarnadelstruktur am 5'-Ende der mRNA des NP Gens die Abhängigkeit der Transkription von VP30 vermittelt, jedoch ist auch hier der mechanistische Hintergrund unklar [94].

Da bisher keine Möglichkeit besteht *in vitro* Transkriptionsexperimente durchzuführen (v.a. aufgrund des Fehlens einer funktionsfähigen rekombinanten Polymerase L), wurde im Rahmen dieses Projekts der Ansatz einer umfassenden Transkriptomanalyse mittels *Next Generation Sequencing* (NGS) gewählt. Das Projekt wurde in enger Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen Becker (Dr. Nadine Biedenkopf; Präparation der RNA-Proben), Hain (Tilman Schultze; *Deep Sequencing*) und Lechner (Dr. Marcus Lechner; bioinformatische Analyse und Aufarbeitung der erhaltenen Rohdaten) bearbeitet.

3.4.1 Transkriptomanalyse EBOV-infizierter humaner Zellen

Bei der Transkriptomanalyse von EBOV-infizierten humanen Zellen (HuH7-Zellen) wurde die RNA (Gesamt-RNA oder RNA < 200 nt) 16 h nach der Infektion mittels des mirVana™ miRNA Isolation Kit (*Life Technologie*) isoliert.

3.4.1.1 Analyse des viralen Transkriptoms über *Next Generation Sequencing* (NGS)

Die für das NGS benötigten Proben wurden entweder (i) auf kleine RNAs (< 200 nt) angereichert (2 Proben) oder (ii) es wurde Gesamt-RNA isoliert. Die entsprechenden RNA-Bibliotheken wurden anschließend bei der vertis Biotechnologie AG hergestellt. Während die Gesamt-RNA auf Poly(A)-RNA angereichert wurde, um v.a. die viralen mRNAs zu sequenzieren, wurden die beiden Proben mit den kleinen RNAs einmal mit und einmal ohne Behandlung mit TEX (Terminator™-5'-Phosphate-Dependent Exonuclease; *Epicentre*) für die Sequenzierung vorbereitet. Eine Behandlung mit TEX dient dazu durch Abbau von RNAs, die ein 5'-Monophosphat tragen, auf primäre Transkripte anzureichen. Dabei werden RNAs mit 5'-OH, 5'-Triphosphat sowie 5'-Kappe nicht degradiert.

(nt 56), wobei auch eine signifikante Anzahl von RNAs an einer alternativen Positionen (nt 57 und 58) starteten.

Am Übergang zum zweiten Gen (VP35) konnten keine kleinen RNAs im Bereich der postulierten Haarnadelstruktur (nt 3032-3053; ΔG : -8.70 kcal/mol) gefunden werden. Dagegen wurden Poly(A)-RNAs wie erwartet mit annotiertem Startpunkt (nt 3032) sowie einer alternativen Startposition (nt 3034) detektiert (s. Abb. 50).

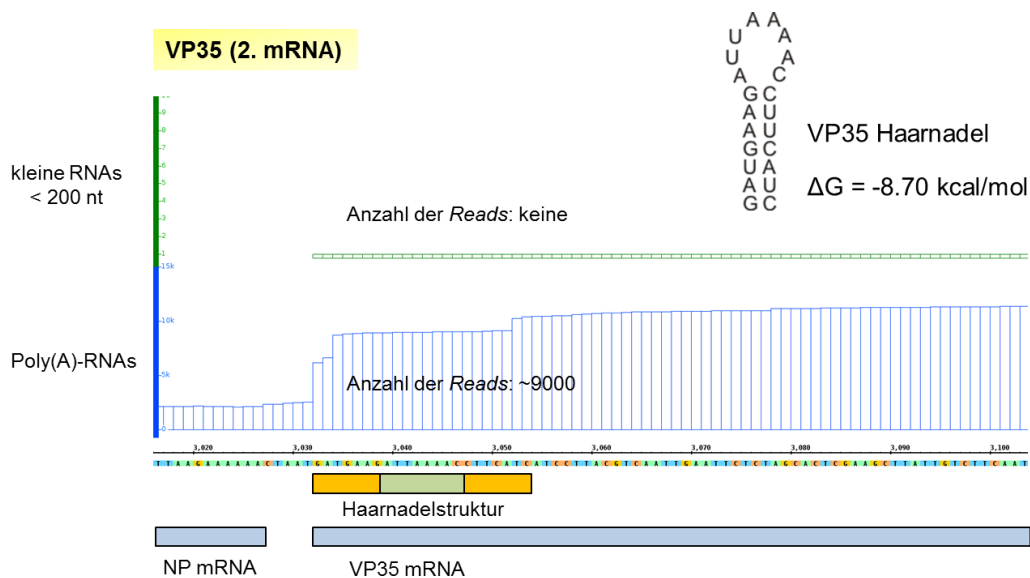


Abb. 50 Darstellung der Sequenzierungsergebnisse für das 2. Gen (VP35). In Grün ist die Bibliothek der kleinen RNAs, in Blau die der Poly(A)-RNAs dargestellt. Im Gegensatz zum vorherigen Gen (NP; s. Abb. 49) konnten an diesem Genstart keine *Reads* in der kleinen RNA-Bibliothek gefunden werden. Die mRNA von VP35 begann am erwarteten Transkriptionsstartpunkt (nt 3032), wobei auch hier ein alternatives Startnukleotid (nt 3034) gefunden wurde. Die Stabilität der VP35-Haarnadelstruktur wurde mit -8.70 kcal/mol kalkuliert (RNAfold).

Am Transkriptionsstart der mRNA von VP40 (3. Gen) konnten einige kleine RNAs identifiziert werden, die am annotierten Transkriptionsstart beginnen (nt 4390), jedoch im Verlauf der potenziellen Haarnadelstruktur abbrechen (ΔG : -18.80 kcal/mol; nt 4390-4448; s. Abb. 51). Im Fall von VP40 begannen die mRNAs an dem aus der Literatur bekannten Transkriptionsstart (nt 4390).

Am Transkriptionsstart des GP-Gens konnten erneut kurze Transkripte (~120 *Reads*) identifiziert werden, die mit der vorhergesagten Sekundärstruktur an dieser Stelle koinzidieren (nt 5900-5936; ΔG : -15.70 kcal/mol; s. Abb. 52). Beim Transkriptionsstart der GP-mRNA gab es neben dem bekannten Startpunkt (nt 5900) keine Hinweise auf alternative Startpositionen.

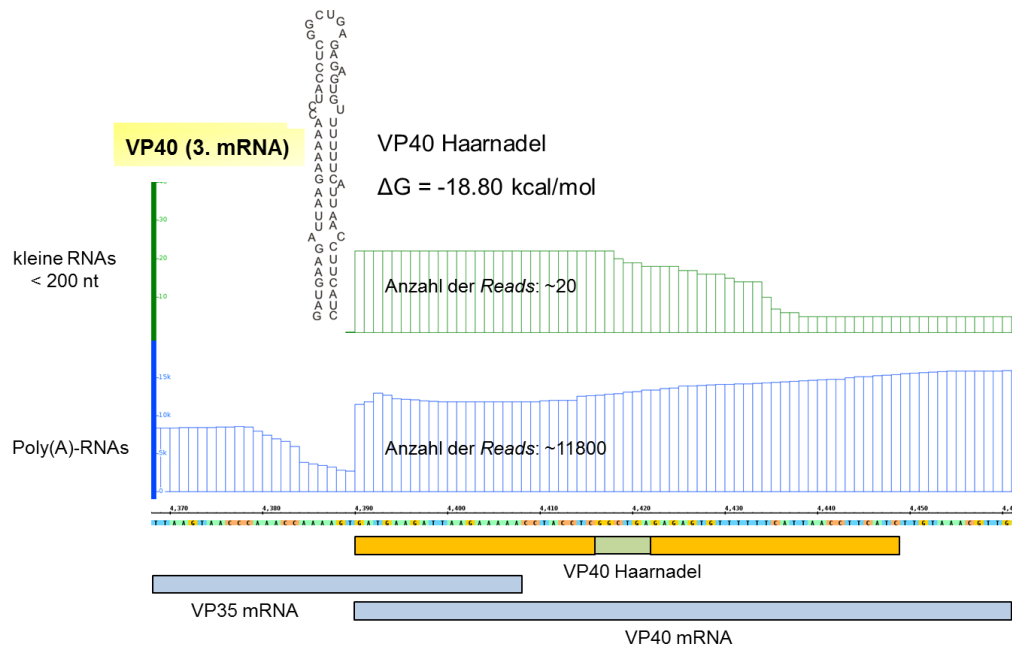


Abb. 51 Darstellung der Sequenzierungsergebnisse für das 3. Gen (VP40). In Grün ist die Bibliothek der kleinen RNAs, in Blau die der Poly(A)-RNAs dargestellt. Bei den kleinen RNAs konnten erneut Abbruch-Transkripte gefunden werden, die im Bereich der potenziellen Haarnadelstruktur liegen (kalkulierte Stabilität: -18.80 kcal/mol). Bei den Poly(A)-RNAs konnten mRNAs mit dem erwarteten Startpunkt detektiert werden (nt 4390).

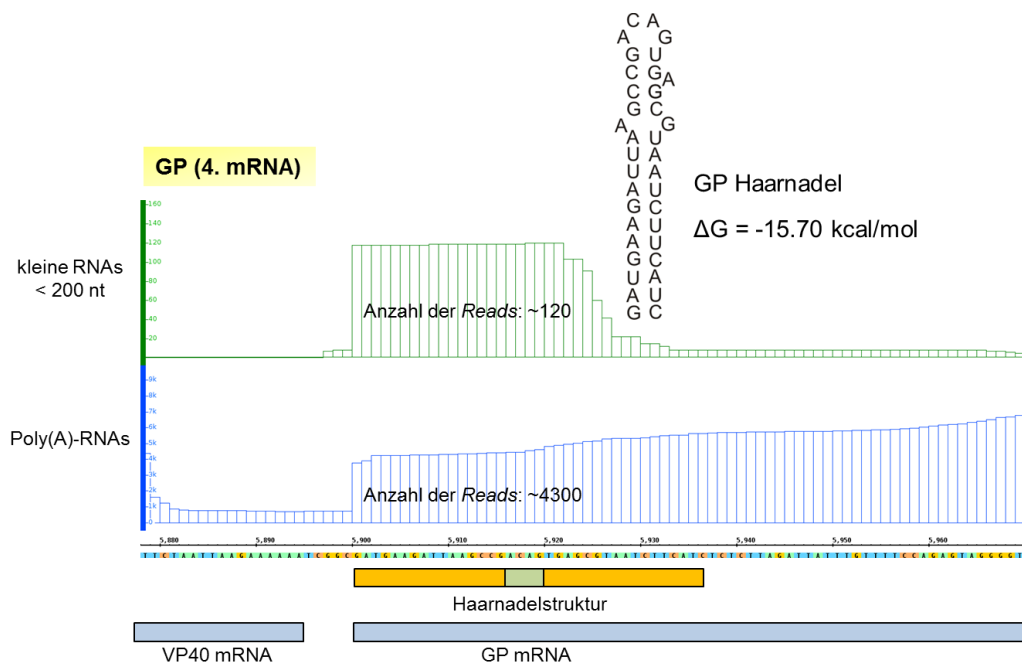


Abb. 52 Darstellung der Sequenzierungsergebnisse für das 4. Gen (GP). In Grün ist die Bibliothek der kleinen RNAs, in Blau die der Poly(A)-RNAs dargestellt. Bei den kleinen RNAs konnten erneut Abbruch-Transkripte gefunden werden, die im Bereich der potenziellen Haarnadelstruktur liegen (kalkulierte Stabilität: -15.70 kcal/mol). Bei den Poly(A)-RNAs hatten die mRNAs ihren Startpunkt an der aus der Literatur bekannten Position (nt 4390).

Das Transkriptionsmuster wiederholte sich auch am Transkriptionsstart der 5. mRNA (VP30). Eine geringe Anzahl kurzer Transkripte wurde im Bereich der Haarnadelstruktur (nt 8288-8336; ΔG : -19.90 kcal/mol) kartiert, während die VP30-mRNA-Initiation dem annotierten Startnukleotid 8288 entsprach (s. Abb. 53).

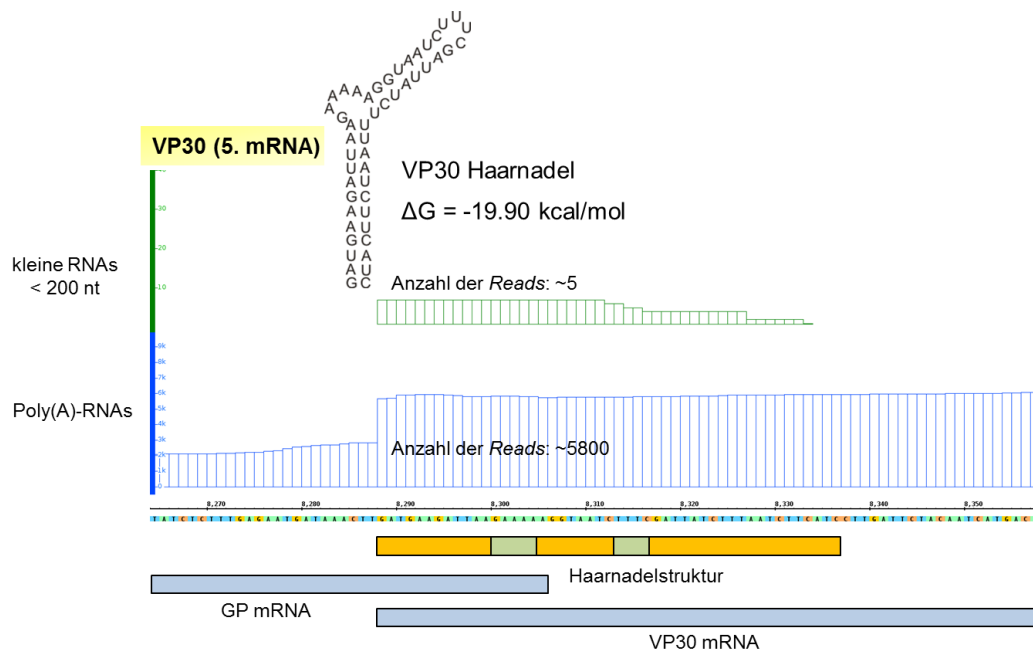


Abb. 53 Darstellung der Sequenzierungsergebnisse für das 5. Gen (VP30). In Grün ist die Bibliothek der kleinen RNAs, in Blau die der Poly(A)-RNAs dargestellt. Bei den kleinen RNAs konnten erneut Abbruch-Transkripte gefunden werden, die mit der vorhergesagten Haarnadelstruktur koinzidieren (kalkulierte Stabilität: -19.90 kcal/mol). Bei den Poly(A)-RNAs konnten mRNAs mit dem erwarteten Startpunkt detektiert werden (nt 8288).

Eine einzigartige Region liegt direkt vor dem 6. Gen, das für VP24 kodiert. Während im viralen Genom nur sehr kurze intergenische Regionen von ca. 6 Nukleotiden oder sogar überlappende Gene vorliegen, befindet sich hier die einzige längere intergenische Region (IGR) von 144 Nukleotiden. Interessanterweise konnten in der kleinen RNA-Bibliothek hier erstmals zwei Transkripte gefunden werden, die innerhalb der IGR starten (s. Abb. 54).

Auch hier ist die potenzielle Funktion dieser intergenischen Transkripte noch völlig unklar. Zusätzlich wurden bei VP24 kurze Transkripte mit gleichen 5'-Enden wie die mRNA detektiert, die aber im 3'-Bereich der vorhergesagten Haarnadelstruktur terminieren (nt 9885-9959; ΔG : -29.10 kcal/mol). Für die mRNA von VP24 wurde der Startpunkt wie erwartet an Position 9885 kartiert.

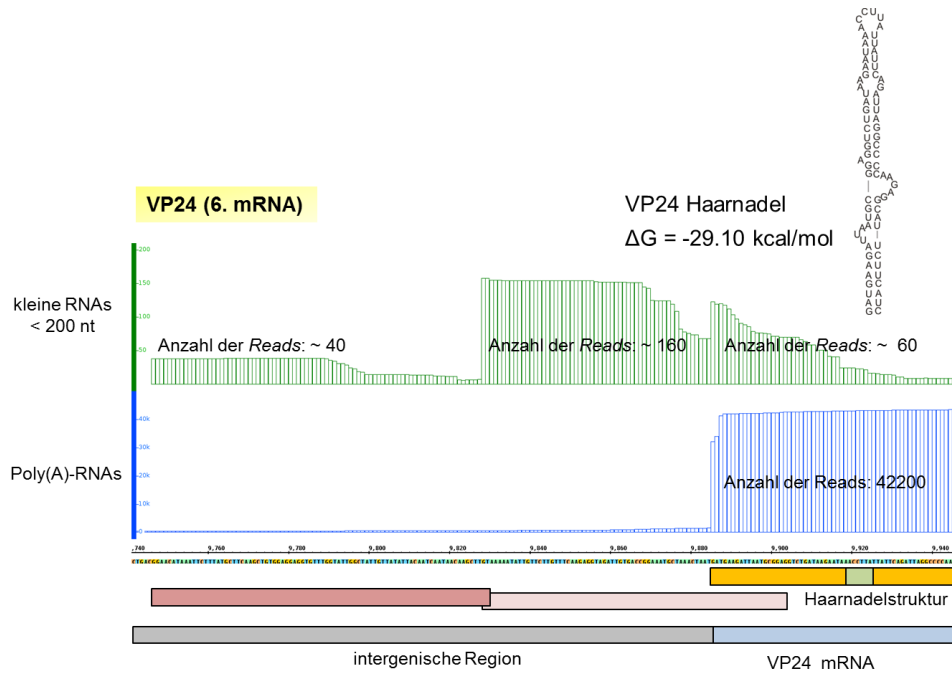


Abb. 54 Darstellung der Sequenzierungsergebnisse für das 6. Gen (VP24). In Grün ist die Bibliothek der kleinen RNAs, in Blau die der Poly(A)-RNAs dargestellt. Bei den kleinen RNAs ist besonders die intergenische Region (IGR) vor der VP24-mRNA interessant; hier konnten zwei kurze Transkripte gefunden werden (rosa gefärbt; vorhergesagte Sekundärstruktur s. Abb. 55); zusätzlich wurden erneut Abbruch-Transkripte im Bereich der Haarnadelstruktur (kalkulierte Stabilität: -29.10 kcal/mol) gefunden, die ihr 5'-Ende am bekannten Startpunkt der VP24-mRNA besitzen. Die Anzahl dieser Reads war mit ca. 60 angegeben; sie werden von abbrechenden Transkripten aus der IGR überlagert und erscheinen daher überrepräsentiert; bei den Poly(A)-RNAs konnten mRNAs hauptsächlich mit erwartetem Startpunkt detektiert werden (nt 9884).

Da die bisher identifizierten mRNA-Transkripte alle mit einer Haarnadel-ähnlichen Sekundärstruktur begannen, wurden auch die beiden Transkripte innerhalb der intergenischen Region (IGR) mittels `RNAfold` strukturell analysiert (s. Abb. 55).

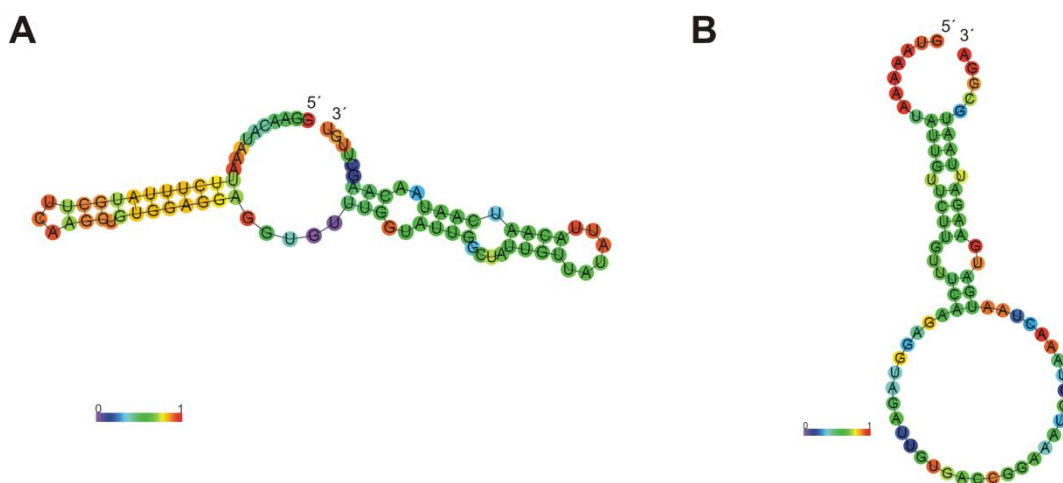


Abb. 55 `RNAfold`-Strukturvorhersage der Transkripte innerhalb der IGR vor dem VP24-Gen. (A) Potenzielle Struktur des ersten Transkripts der IGR (nt 9746-9829) (B) Mögliche Struktur des zweiten Transkripts innerhalb der IGR (nt 9828-9902); die Sequenzbereiche sind in Abb. 54 rosa hervorgehoben.

Für beide Transkripte wird die Ausbildung einer Haarnadelstruktur vorhergesagt, jedoch konnte das Abbruchmuster nur im Fall des zweiten IGR-Transkriptes mit der möglichen Haarnadelstruktur korreliert werden.

Beim 7. und letzten Gen (Polymerase L) wurde ein ähnliches Muster wie bei den übrigen Genen gefunden (s. Abb. 56). Bei den kleinen RNAs wurden kurze Abbruchtranskripte im Bereich der Haarnadelstruktur detektiert (nt 11501-11570; ΔG : -21.90 kcal/mol), während der Transkriptionsstart für die mRNA erwartungsgemäß an Position 11501 erfolgte.

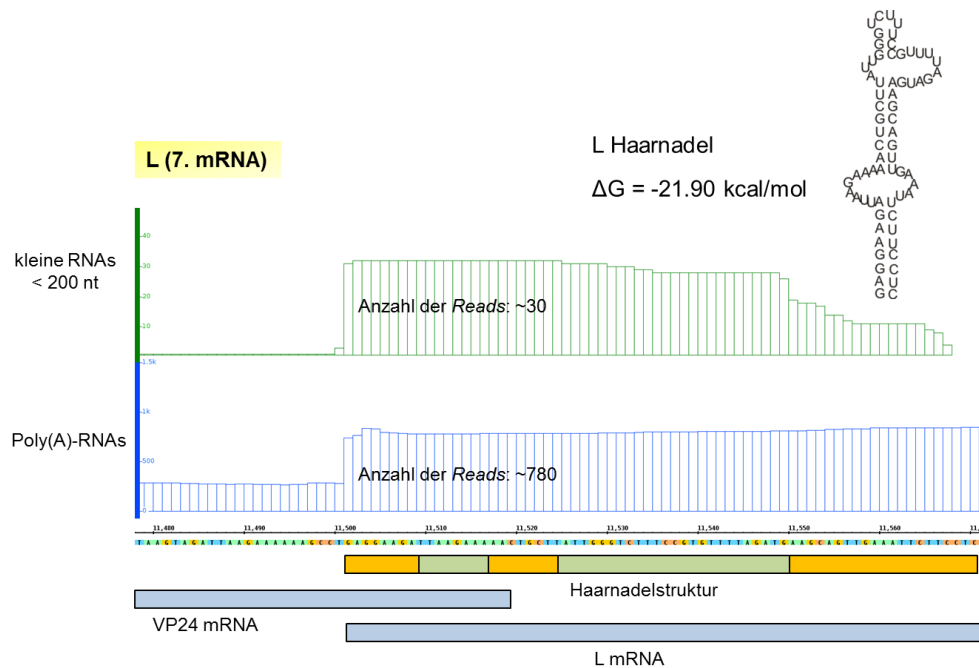


Abb. 56 Darstellung der Sequenzierungsergebnisse für das 7. Gen (L). In Grün ist die Bibliothek der kleinen RNAs, in Blau die der Poly(A)-RNAs dargestellt. Bei den kleinen RNAs konnten erneut Abbruch-Transkripte gefunden werden, die im Bereich der Haarnadelstruktur (kalkulierte Stabilität: -21.90 kcal/mol) terminieren. Bei den Poly(A)-RNAs wurde das 5'-Ende auf den bekannten Startpunkt kartiert (nt 8288).

Bei der hier durchgeführten Transkriptomanalyse war vor allem im Bereich der kleinen RNAs die Entdeckung der kurzen RNA-Transkripte neu und überraschend. Somit konnten erstmals drei nicht-kodierende RNAs in Bereichen außerhalb der sieben viralen Gene identifiziert werden, im *leader*-Bereich und in der intergenischen Region zwischen VP30 und VP24. Außerdem liegt durch die regelmäßige Detektion (mit Ausnahme von VP35; s. Interpretation) von kleinen Abbruchtranskripten im Bereich der potenziellen Haarnadelstrukturen die Vermutung sehr nahe, dass die vorhergesagten Haarnadelstrukturen auch tatsächlich im physiologischen Kontext gebildet werden.

3.4.1.2 Experimenteller Nachweis einer viralen nicht-kodierenden RNA (*leader*-Transkript)

Experimenteller Nachweis über Northern Blot

Im Rahmen der Transkriptomanalyse von EBOV-infizierten Zellen konnte die Existenz eines *leader*-Transkriptes nachgewiesen werden. Auf Basis der *Deep Sequencing* Daten schienen die *leader*-Transkripte nur mit einer ~0.1%igen Häufigkeit im Vergleich zur ersten mRNA in den infizierten Zellen vorzuliegen, jedoch wurden die beiden RNA-Bibliotheken mit verschiedenen RNA-Proben und Prozeduren hergestellt. Aus diesem Grund sollte die Existenz des *leader*-Transkriptes sowie dessen Verhältnis zur mRNA des NP-Gens experimentell mit einer unabhängigen Methode untersucht werden.

Es wurden zwei verschiedene Digoxigenin-markierte Sonden verwendet, die entweder an das *leader*-Transkript (Sonde nt 80-1) oder an die mRNA (Sonde nt 154-79) hybridisieren konnten (s. Abb. 57 A). Bei der Verwendung einer Referenz-RNA (nt 2-158) zeigten beide Sonden ähnliche Signalstärken (Sonde nt 80-1 rief aufgrund des höheren U-Anteils ein leicht stärkeres Signal hervor), weshalb die entstandenen Signale semi-quantitativ miteinander verglichen werden konnten (s. Abb. 57 B).

Um die Spezifität der Sonden zu zeigen, wurden verschiedene *in vitro* Transkripte verwendet. Die Referenz-RNA 2-78 repräsentierte dabei die Sequenz des *leader*-Transkriptes und die Referenz-RNA 56-158 die Startregion der NP-mRNA. Die genomische RNA 154-1 sowie eine Mock-Kontrolle (Gesamt-RNA aus nicht-infizierten Zellen) wurden als Negativ-Kontrollen zur Verifizierung der Spezifität der Sonden ebenfalls in die Untersuchungen mit einbezogen. Die für den experimentellen Nachweis benötigte Gesamt-RNA aus EBOV-infizierten Zellen wurde von Dr. Nadine Biedenkopf (AG Becker) isoliert.

Mittels Northern Blot (unter Verwendung der beschriebenen Sonden und Referenz-RNAs) konnte das *leader*-Transkript in erwarteter Länge experimentell bestätigt werden (s. Abb. 57 C). Es erschien als eine leicht inhomogene Bande unterhalb der Marker-RNA (77 nt; *in vitro* Transkript 2-78), was der erwarteten Größe und Heterogenität der *Reads* aus dem *Deep Sequencing* entspricht. In Kombination mit dem Nachweis der mRNA im Northern Blot konnte das Verhältnis zwischen mRNA und *leader*-Transkript abgeschätzt werden: während das *leader*-Transkript bei Einsatz von 20-40 µg Gesamt-RNA nachweisbar wurde, konnte die mRNA bereits bei etwa 10-15 µg detektiert werden. Das Verhältnis dieser beiden RNAs lag demnach etwa bei ca. 1:5 bis 1:10 *leader*-Transkript:mRNA (s. Abb. 57 C).

Dennoch ist an dieser Stelle anzumerken, dass bei dem Nachweis der mRNA die Spezifität nicht gewährleistet werden konnte, da die Signale aufgrund der Größe der mRNA in den Geltaschen verblieben. In einem weiteren Experiment wurden 40 µg RNA der Mock-Kontrolle eingesetzt (hier nicht gezeigt), wobei nur die Spezifität des Nachweises des *leader*-Transkriptes eindeutig bestätigt werden konnte, nicht jedoch die Spezifität für die mRNA.

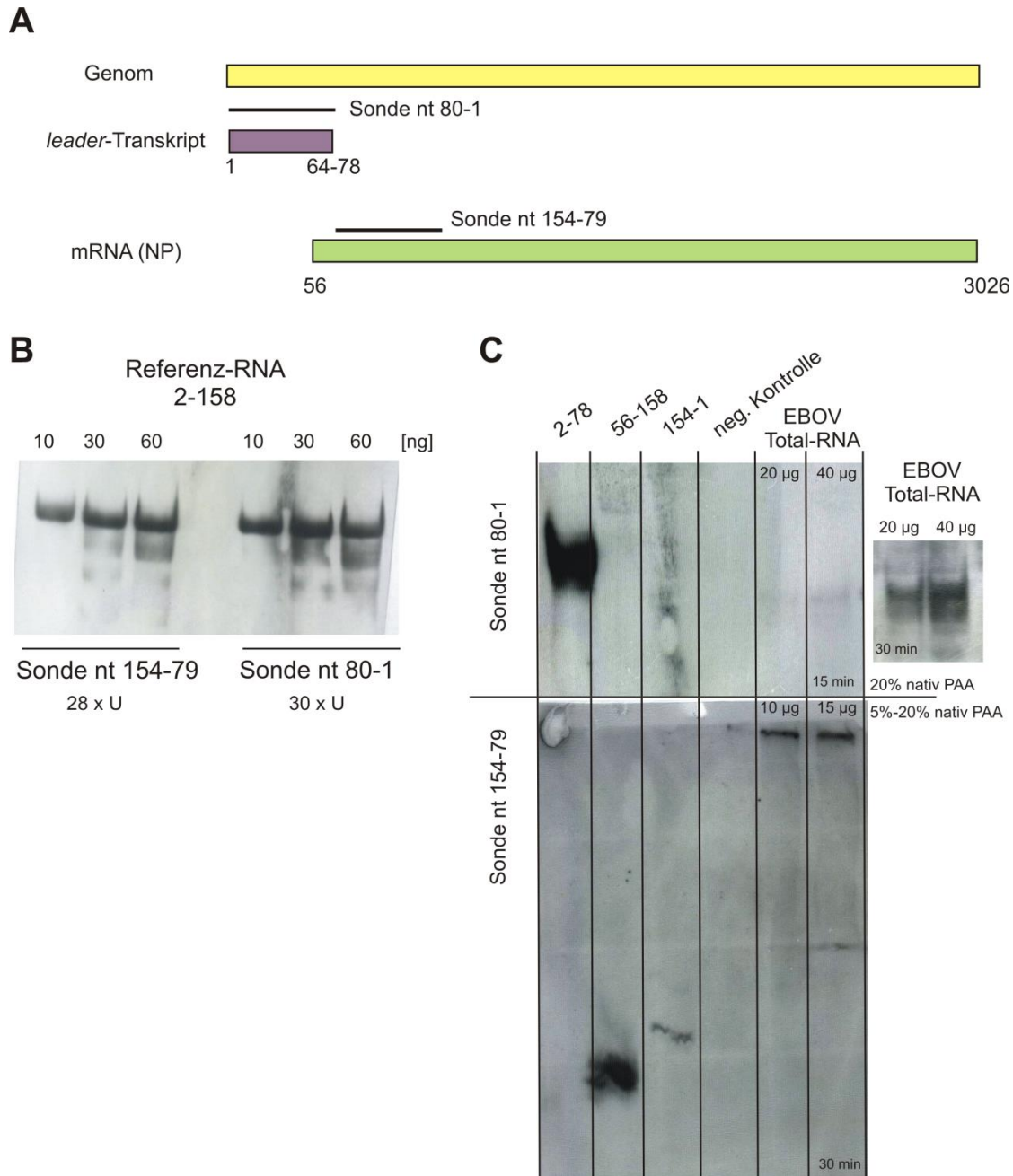


Abb. 57 Experimenteller Nachweis des *leader*-Transkriptes und der NP-mRNA mittels Northern Blot. **(A)** Schema des Northern Blot-Experiments. Die zu detektierenden RNA-Spezies sind das *leader*-Transkript (violett) und die NP-mRNA (grün), für die zwei unterschiedliche Sonden verwendet wurden. Sonde nt 80-1 ist in der Lage mit dem *leader*-Transkript zu hybridisieren, während Sonde nt 154-79 spezifisch für die mRNA von NP ist. **(B)** Ein Vergleich der beiden Digoxigenin-markierten Sonden mit der Referenz-RNA nt 2-158, die zu beiden Sonden komplementär ist, zeigte, dass beide ein Signal von ähnlicher Intensität hervorrufen. Das Signal für die Sonde nt 80-1 erscheint leicht intensiver, was auf die höhere Anzahl an Uridinen in der Sequenz zurückzuführen ist. **(C)** Nachweis des *leader*-Transkriptes im Vergleich zur mRNA (NP). Oben: die Referenz-RNA 2-78 (10 ng; entspricht der *leader*-Sequenz) diente als Positiv-Kontrolle sowie als Größenmarker für das erwartete Signal des *leader*-Transkriptes; die Referenz-RNAs 56-158 (10 ng; entspricht der mRNA-Startsequenz) und 154-1 (10 ng; genomische RNA) diente als zusätzliche Negativ-Kontrolle zur Verifizierung der Sonden-Spezifität; in der Spur „neg. Kontrolle“ wurde 1 µg Mock-RNA (Gesamt-RNA aus nicht-infizierten Zellen) aufgetragen; das *leader*-Transkript konnte unter Verwendung von 20-40 µg Gesamt-RNA aus Ebolavirus-infizierten Zellen nachgewiesen werden, wobei hier zwei verschiedene Expositionszeiten dargestellt sind (links: 15 min, rechts: 30 min). Unten: analoge Auftragung wie oben; hier entspricht die Referenz-RNA 56-158 der Positiv-Kontrolle, da diese die Sequenz der mRNA-Startregion repräsentiert. Die mRNA erschien als Signal bei 10-15 µg Gesamt-RNA, verblieb jedoch in den Geltaschen.

Experimenteller Nachweis über RT-qPCR

Aus den oben genannten Gründen wurde RT-qPCR als zweite Methode verwendet, um das Verhältnis zwischen mRNA und *leader*-Transkript zu quantifizieren.

Dies wurde erreicht, indem ausgehend von Gesamt-RNA-Proben aus EBOV-infizierten Zellen cDNA mit drei verschiedenen *Primern* synthetisiert wurde. Die hierbei relevanten RNA-Spezies waren: das *leader*-Transkript, die NP mRNA und das Antigenom. Zur Kontrolle wurden auch hier Mock-Proben (Gesamt-RNA aus nicht-infizierten Zellen) miteinbezogen (s. Kap. 2.7.7 und Abb. 58 A).

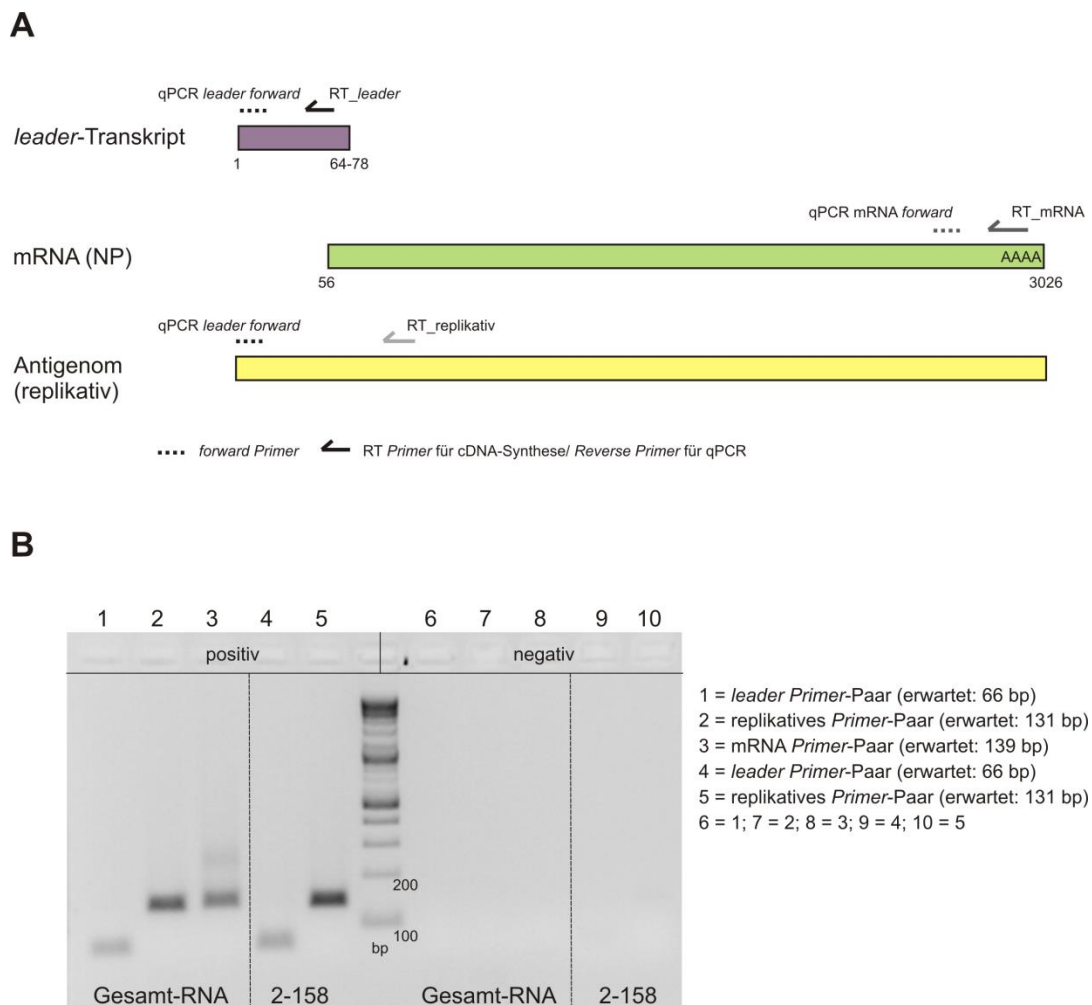


Abb. 58 Nachweis von drei viralen RNA-Spezies mittels RT-qPCR. **(A)** Schema der RT-qPCR. Die drei relevanten RNA-Spezies (*leader*-Transkript, mRNA (NP) und Antigenom) wurden mit drei RT-*Primern* in cDNA umgeschrieben (durchgezogene Pfeile). Für die folgende qPCR wurden drei *Primer*-Paare verwendet, um die jeweilige RNA-Spezies zu amplifizieren (gepunktete Linie und durchgezogene Pfeile). Hierbei ist zu erwähnen, dass keine Spezifität der Detektion des *leader*-Transkriptes gegeben ist, da bei Einsatz des RT-*Primers* RT_*leader* und des *Primer*-Paares qPCR *leader* forward und RT_*leader* bei der qPCR sowohl das *leader*-Transkript als auch das Antigenom amplifiziert werden; dies wurde bei der nachfolgenden Auswertung (s. unten) berücksichtigt. Die Nachweise der mRNA und des Antigenoms sind dagegen für die jeweilige RNA-Spezies spezifisch. **(B)** Aus der qPCR resultierende PCR-Produkte auf einem 1% Agarosegel. Spuren 1-5 stellen die Positiv-Proben dar: Spuren 1-3 basieren auf der cDNA der Gesamt-RNA (aus EBOV-infizierten Zellen), es erfolgten die Nachweise für *leader* (Spur 1), Antigenom (Spur 2) und mRNA (Spur 3); Spuren 4 und 5 zeigen das PCR-Ergebnis auf Basis eines *in vitro* Transkriptes (nt 2-158). Spuren 6-10 zeigen die entsprechenden Negativ-Kontrollen zu den Spuren 1-5 (die PCR erfolgte in diesem Fall mit RNA-Proben, bei denen keine Reverse Transkription durchgeführt wurde).

Nach Synthese der cDNA wurde eine quantitative *real-time* PCR durchgeführt, der drei verschiedene *Primer*-Paare zugrunde lagen, die zum Amplifizieren der *leader*-Transkript cDNA, der mRNA cDNA sowie der replikativen cDNA verwendet wurden (zur Durchführung s. Kap. 2.7.7). Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden zur Kontrolle einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen (s. Abb. 58 B). Die Positiv-Proben, basierend auf der cDNA der Gesamt-RNA, zeigten die erwarteten PCR-Fragmente. Die Effizienz der PCR für *leader*-Transkript und Antigenom wurde mit Hilfe eines *in vitro* Transkripts (nt 2-158) überprüft (und auf Basis der C_T -Werte für vergleichbar befunden; Daten hier nicht gezeigt), wobei hier zur Gesamt-RNA äquivalente PCR-Produkte entstanden. Die entsprechenden Negativ-Proben zeigten erwartungsgemäß keine Produktbanden (s. Abb. 58 B).

Bei der RT-qPCR wurden C_T -Werte erhalten, die dem Zyklus entsprechen, bei dem das Fluoreszenzsignal den Hintergrund überschreitet (s. Abb. 59 A). Diese lagen bei den relevanten RNA-Spezies bei ~12-18. Die zusätzlich als Negativ-Kontrollen verwendeten Mock-Proben führten zu keinem detektierbaren C_T -Wert, was die Spezifität des Nachweises für die RNA des Ebolavirus bestätigte. Da bei der PCR der *leader*-Transkript cDNA auch replikative RNA-Moleküle amplifiziert wurden, wurde eine modifizierte Auswertung angewandt, um dies zu berücksichtigen (s. Abb. 59 B).

Bei der Auswertung wurden zunächst die Differenzen aus den Zyklenzahlen (C_T -Werte) des *leader*/Antigenom-Gemischs (abgekürzt: leader/repl) bzw. des Antigenoms (abgekürzt: repl) mit der Zyklenzahl der mRNA gebildet (Formel (I); s. Abb. 59 B). Im zweiten Schritt (Formel (II); s. Abb. 59 B) wurde das Verhältnis dieser beiden RNA-Spezies (leader/repl und repl) zur mRNA berechnet, wobei die exponentielle Vermehrung der PCR-Produkte berücksichtigt wurde. Die Ergebnisse waren hierbei ein 37-facher Überschuss an mRNA gegenüber replikativer RNA und ein 7.2-facher Überschuss an mRNA gegenüber dem leader/repl-Gemisch. Zuletzt wurde das Verhältnis über den Quotienten aus mRNA und *leader* erhalten (Formel(III)), der in der gezeigten Beispielrechnung bei 8.94 lag. Auf Basis dieser Berechnung konnte unter Verwendung von drei unabhängigen RNA-Präparationen, die jeweils in zwei Experimenten vermessen wurden, ermittelt werden, dass die mRNA im ca. 8.7-fachen (± 1.4) Überschuss zum *leader*-Transkript vorliegt (s. Abb. 59 C).

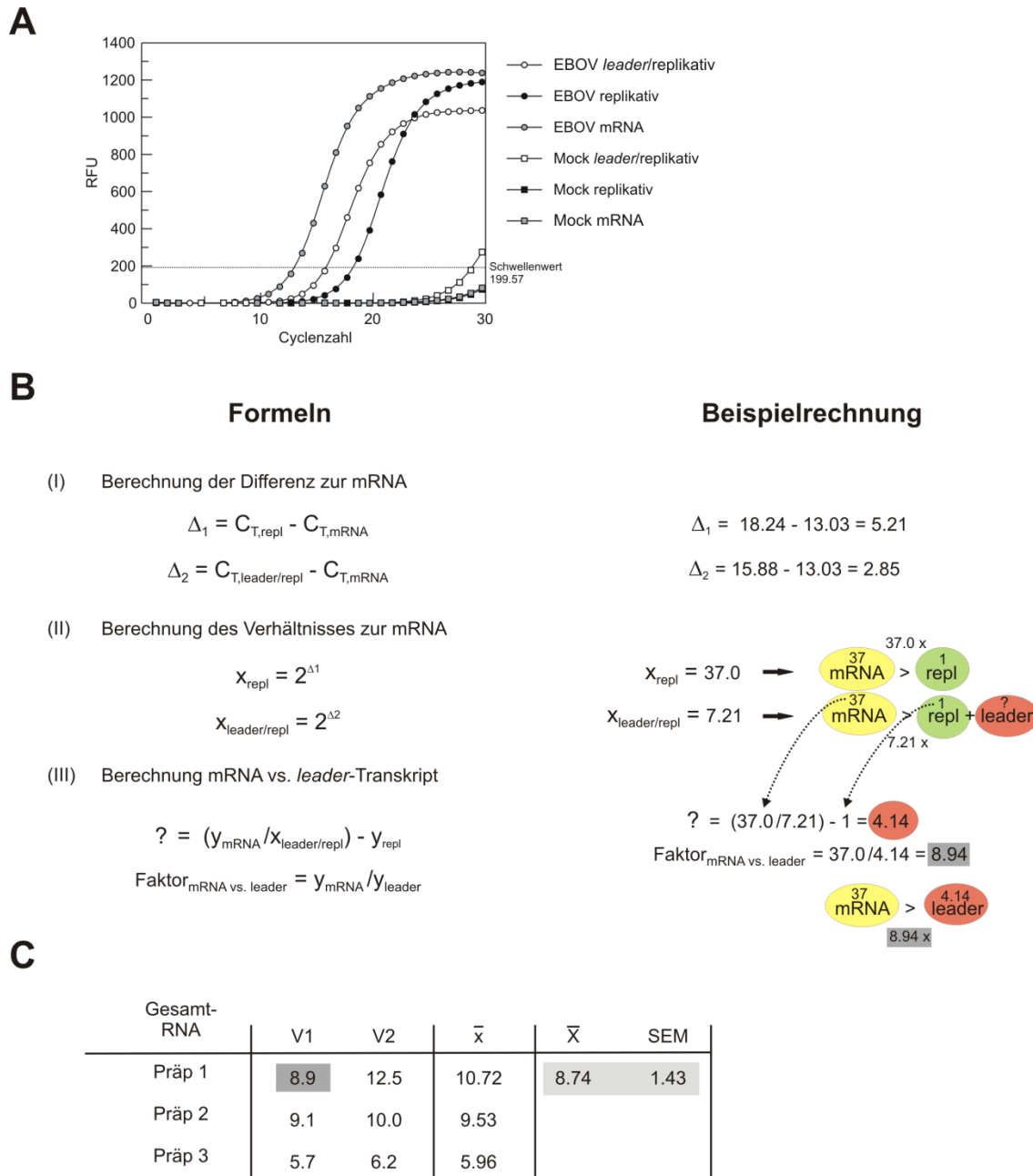


Abb. 59 Auswertung der RT-qPCR. **(A)** Beispielhaftes Ergebnis der RT-qPCR. Die Kurven zeigen die Zunahme der relativen Fluoreszenz (RFU) aufgrund der exponentiellen Vermehrung der PCR-Produkte. Die drei relevanten RNA-Spezies zeigten eine solche Zunahme der Fluoreszenz, wobei der C_T -Wert dem Zyklus entspricht, bei dem das Fluoreszenz-Signal den Hintergrund (gestrichelte Linie) überschreitet. Die zur Kontrolle verwendeten Mock-Proben führten erwartungsgemäß zu keinem dokumentierbaren C_T -Wert. **(B)** Formeln und Beispielrechnung zur Ermittlung des Verhältnisses von mRNA zu *leader*-Transkript. (I) C_T entspricht den erhaltenen Zyklenzahlen der Rohdaten, wobei zunächst die Differenzen aus *leader*/replikativ-Gemisch und mRNA bzw. Antigenom und mRNA gebildet wurden (repl = replikativ; leader/repl = Gemisch aus *leader*-Transkript und Antigenom); (II) Die erhaltenen Differenzen wurde zur Berücksichtigung des exponentiellen Vermehrungszyklus verrechnet, wobei hier das Verhältnis der jeweiligen RNA-Spezies zur viralen mRNA erhalten wurde (x-Werte); (III) auf Basis der aus (II) erhaltenen Werte wurden Absolutzahlen (y-Werte) gebildet, über die das Verhältnis von mRNA zu *leader*-Transkript schließlich über ihren Quotienten gebildet wurden. Dieser repräsentiert den Anteil des Antigenoms, der in der PCR simultan zum *leader*-Transkript amplifiziert wurde. **(C)** Ergebnis der RT-qPCR. Es wurden drei verschiedene RNA-Präparationen (Präp 1, Präp 2, Präp 3) verwendet, von denen jeweils zwei Messungen durchgeführt wurden (V1 und V2); die Werte entsprechen hier dem nach (B) berechneten Faktor. In der darauffolgenden Spalte wurde der Mittelwert aus den beiden Einzelmessungen gebildet, der in der letzten Spalte wiederum zu einem Gesamtmittelwert verrechnet wurde; SEM bezeichnet den dazugehörigen *standard error of the mean*.

3.4.1.3 Zusammenfassung und physiologische Interpretation der Ergebnisse

Neben der Detektion und 5'-End-Kartierung der mRNAs der verschiedenen Gene lieferte die Transkriptomanalyse von EBOV-infizierten Zellen vor allem im Bereich der kleinen RNAs neue Erkenntnisse: (i) es konnten drei nicht-kodierende RNAs im *leader*-Bereich und der intergenischen Region (zwischen VP30 und VP24) identifiziert werden und (ii) es wurden kurze Abbruch-Transkripte gefunden, die alle mit einer Termination an den vorhergesagten Haarnadelstrukturen in den 5'-terminalen Bereichen der verschiedenen mRNA-Starts erklärt werden können.

Über die Sequenzierung der mRNAs sollten ihre Expressionslevel beurteilt werden. Beim Vergleich der Sequenzier-Profile der viralen mRNAs fiel auf, dass sich die Verteilung der *Reads* sehr unterschiedlich gestaltete (s. Abb. 60). Beispielsweise akkumulierten *Reads* bei NP und VP24 vor allem im Anfangsbereich der mRNA, während bei GP und vor allem bei L mehrere, über die gesamte mRNA verteilte Bereiche verstärkt gefunden wurden. Um den verschiedenen Profilen gerecht zu werden, wurde eine Quantifizierung gewählt, bei der alle *Reads* summiert und dann auf die Länge der mRNA normiert wurden (s. Tab. 43).

Dabei konnte ein Gradient der mRNAs vom ersten (NP) bis zum letzten Gen (L) beobachtet werden, der jedoch von GP durchbrochen wurde, da hier die höchste längennormierte *Read*-Anzahl nach NP ermittelt wurde. Interessanterweise ergab sich ein ähnliches Bild im Fall der kleinen RNAs (< 200 nt), da hier ebenfalls GP zu den Vertretern mit den meisten *Reads* gehörte (s. Tab. 43).

In einer anderen NGS-Studie wurde auf Grundlage des Medians der vorhandenen mRNA-*Reads* ebenfalls ein mRNA-Gradient über das Genom des Ebolavirus sowie des nah verwandten Marburgvirus berichtet [84]. In dieser Studie wurden zwei verschiedene Zelllinien verwendet, die zelltypabhängige Unterschiede in den mRNA-Expressionsniveaus vermuten ließen. Im Vergleich zu den hier vorgestellten Daten wurden neben einer anderen Quantifizierung (Median vs. längennormierter Mittelwert) auch andere Prozeduren zur Herstellung der RNA-Bibliotheken sowie zur Sequenzierung und Evaluation der Rohdaten verwendet, was (neben dem erwähnten Unterschied in der verwendeten Zelllinie) die Ergebnisse nicht direkt vergleichbar macht und Grund für die beobachteten Unterschiede sein könnte.

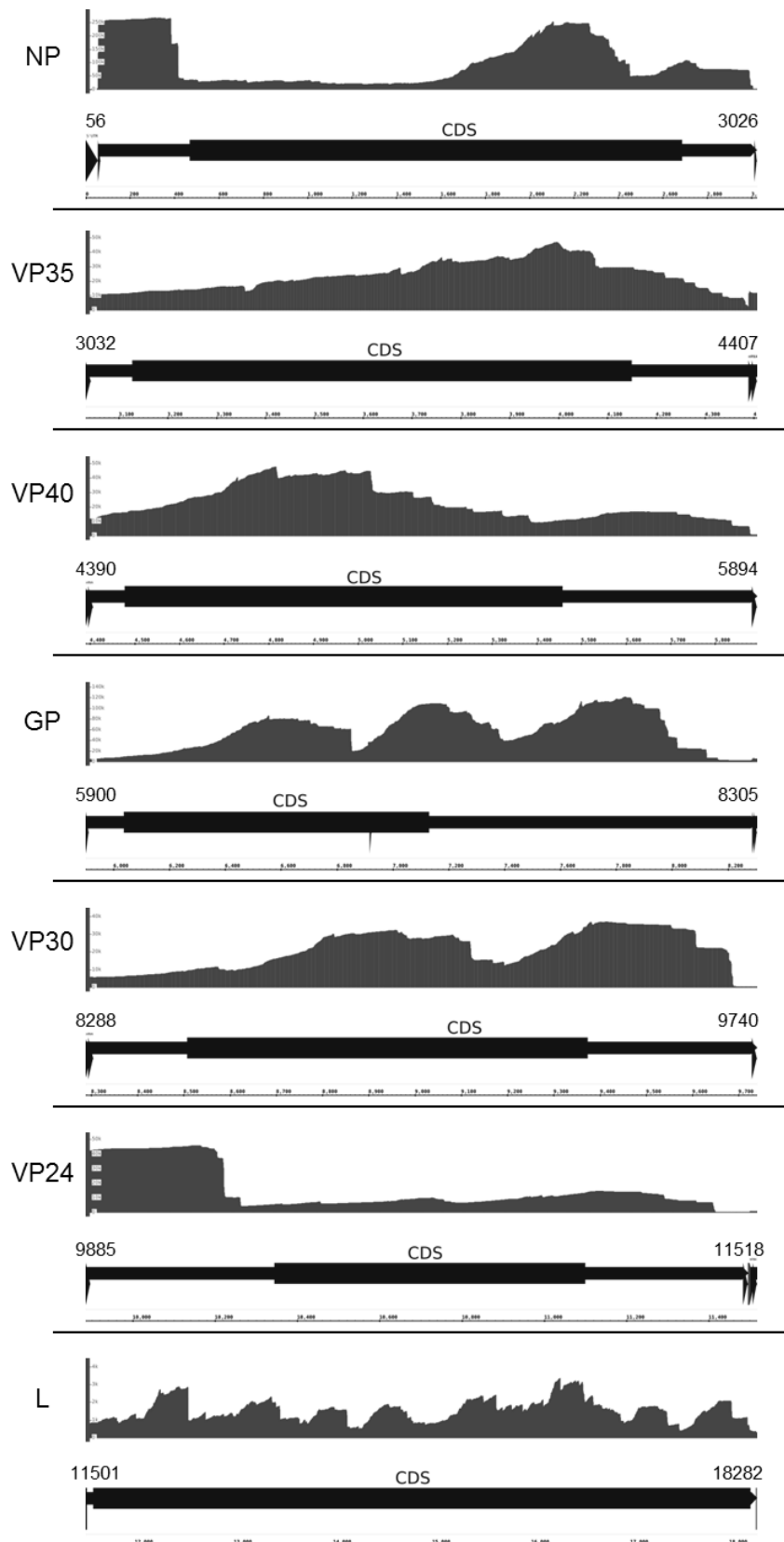


Abb. 60 Übersicht über die Sequenzierungsmuster der verschiedenen viralen mRNAs. Die einzelnen mRNAs wiesen ein sehr unterschiedliches Profil auf: Während die mRNAs von NP und VP24 vor allem in der Anfangsregion durch hohe *Read*-Zahlen repräsentiert wurden, akkumulierten *Reads* im Fall von GP und VP30 an 2-3 internen Regionen der mRNA. Bei der mRNA für L, die die längste mRNA des viralen Genoms repräsentiert, wurden über die ganze Länge verteilt *Read-Peaks* beobachtet [Abbildung von Dr. Marcus Lechner].

Ein umfassender Überblick über die erhaltenen Daten aus dem *Deep Sequencing* wird inklusive der vorhergesagten Haarnadelstruktur-Stabilitäten in der folgenden Tabelle (s. Tab. 43) gegeben.

Tab. 43 Übersicht über die Quantifizierung der mRNAs (längennormiert) sowie der kleinen RNAs mit Angaben zur kalkulierten Stabilität der 5'-terminalen Haarnadelstrukturen auf Genom und Antigenomebene in kcal/mol. Bei den mRNA-Levels wurde die Summe aller *Reads* für die entsprechende mRNA in Bezug auf ihre Länge zugrunde gelegt; die Kalkulation der Haarnadelstabilitäten wurde mit *RNAfold* auf Basis der MFE-Struktur durchgeführt, hierbei wurden bei den (+) RNA-Strukturen zwei Nukleotide in 3'-Richtung, bei den (-)RNA-Strukturen zwei Nukleotide 5'-sowie 3'- von der Haarnadelstruktur hinzugefügt, um die authentische Umgebung zu berücksichtigen.

	mRNA Länge [nt]	Summe der Reads	mRNA-Level (längennormiert)	kleine RNAs	(+)RNA [kcal/mol]	(-)RNA [kcal/mol]
NP	2971	857121	288	199	-10.30	-6.80
VP35	1376	107215	77	--	-8.70	-13.60*
VP40	1505	99553	66	22	-18.80	-22.80
GP	2406	408492	169	118	-15.70	-16.50
VP30	1453	89290	61	7	-19.90	-17.30
VP24	1612	78291	48	61	-29.10	-22.10
L	6782	67394	9	32	-21.90	-17.60

*die kalkulierte Haarnadel ist in diesem Fall um zwei Basenpaare verlängert aufgrund der Umgebung im viralen Genom.

Es liegt die Vermutung nahe, dass zwischen der Stabilität der Haarnadelstrukturen und der Effizienz in der mRNA-Initiation ein direkter Zusammenhang bestehen könnte.

Durch Auflistung der mRNAs und der kleinen RNAs nach ihrer *Read*-Häufigkeit im Vergleich zu den berechneten Stabilitäten der Haarnadelstrukturen auf (+) und (-) RNA-Ebene sollte ein möglicher direkter Zusammenhang visualisierbar sein (s. Tab. 44).

Tab. 44 Anordnung der RNAs nach *Read*-Häufigkeiten und der Haarnadelstrukturen entsprechend ihrer Stabilität. Die mRNAs und kleine RNAs wurden nach absteigender Häufigkeit, die Haarnadeln nach zunehmender Stabilität geordnet.

	mRNA Level (längennormiert)	kleine RNAs	(+) RNA [kcal/mol]	(-) RNA [kcal/mol]
1	NP	NP	VP35	NP
2	GP	VP24	NP	VP35
3	VP35	GP	GP	GP
4	VP40	L	VP40	VP30
5	VP30	VP40	VP30	L
6	VP24	VP30	L	VP24
7	L	VP35	VP24	VP40

Anhand der hier gezeigten Quantifizierungen konnte kein direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl der *Reads* (mRNAs oder kleine RNAs) und der Stabilität der Haarnadelstrukturen gefunden werden. Ein Beispiel dafür ist NP, das sowohl die meisten mRNAs und kleine RNAs und gleichzeitig vergleichsweise instabile Sekundärstrukturen im 5'-Bereich des Gens

Bei genauerer Betrachtung der im *Deep Sequencing* identifizierten *leader*-Transkripte in Form eines Alignments (s. Abb. 61) zeigte sich, dass die *Reads* ausnahmslos an Position 2 des Antigenoms beginnen. Dies lässt den Schluss zu, dass die Transkription des *leaders* an Position 2 initiiert wird. Desweiteren war auffällig, dass in den 3'-Bereichen der *Reads* die Sequenzen im Vergleich zur Referenz (1. Zeile in Abb. 61) fehlerbehaftet zu sein scheinen. Dies ist hier am Beispiel des *leader*-Transkriptes gezeigt, wurde aber bei allen kleinen RNAs beobachtet. Da dies sehr unwahrscheinlich auf Sequenzierfehler zurückzuführen ist, könnte eine Interpretation sein, dass die virale Polymerase L in diesen Bereichen, möglicherweise aufgrund der sich ausbildenden Haarnadelstrukturen, die Haftung zum Templat verliert und zum Teil templatunabhängig verlängert.

Die *in vivo* Ausbildung der verschiedenen potenziellen Haarnadelstrukturen an den 5'-Enden der mRNAs wurde bisher nicht bewiesen. In den hier gezeigten Daten konnten eindeutig für sechs der sieben mRNAs kurze Transkripte detektiert werden, die im 3'-Bereich der vorhergesagten Strukturen abbrachen. Es könnte daher eine Terminationsfunktion der Haarnadelstrukturen auf mRNA-Ebene vermutet werden. Erwähnenswert ist an dieser Stelle die Beobachtung, dass bei Untersuchung der transkriptionellen Regulation durch VP30 die Transkription des ersten Gens (NP) aufgrund seiner Haarnadelstruktur (nt 56-78) von der Präsenz von VP30 abhängig ist, dies jedoch für VP35 nicht der Fall zu sein scheint [94]. In den hier vorgestellten NGS-Daten wurden nur für VP35 keine Abbruchtranskripte gefunden und auch die antigenomische Haarnadelstruktur wurde bei der VP35-mRNA als die von allen Ebola-viralen mRNAs instabilste vorhergesagt. Beide Beobachtungen deuten an, dass die Transkription der VP35 mRNA VP30-unabhängig sein könnte, da die ausgebildete Haarnadelstruktur an dieser mRNA möglicherweise zu instabil ist, um eine Termination zu vermitteln.

Ob sich die Haarnadelstrukturen auf Genomebene ausbilden und dort eine regulatorische Funktion einnehmen, kann zu diesem Zeitpunkt nicht beurteilt werden. Es erscheint zunächst aufgrund der Enkapsidierung des Genoms mit NP unwahrscheinlich. Jedoch wäre es denkbar, dass im Zuge des Verdrängens von NP während der Transkription die kurzzeitig für den Polymerase-Komplex zugängliche RNA die entsprechende Sekundärstruktur ausbilden könnte. Da die Transkriptionsstartregion bei allen Genen eine konservierte Sequenz aufweist (3'-CUXCUUCUAAUUN-5'; wobei X = A oder C und N = A, C oder U sein können), könnte die Effizienz der Transkriptionsinitiation beispielsweise durch Ausbildung von Strukturen auf dem viralen Genom reguliert werden. Bei diesem Prozess scheint VP30 eine entscheidende Rolle zu spielen, da bei einer Destabilisierung der Haarnadelstruktur des NP-Gens (allerdings primär auf mRNA-Ebene) die strikte Abhängigkeit des Transkriptionsprozesses von VP30 aufgehoben wurde [94]. Es wäre denkbar, dass die Haarnadelstrukturen auf

Genomebene nach Ausbildung dem Polymerase-Komplex als eine Art Barriere dienen, an der er die neue Transkriptions-Startregion erkennt, die Transkription reinitiiert und mithilfe von VP30 die Affinität zum Templat an dieser Stelle aufrechterhält. Dieser Sachverhalt muss jedoch experimentell noch genauer untersucht werden (s. Ausblick).

Bei den hier vorgestellten Daten konnte erstmals eine antigenomische *leader*-RNA des Ebolavirus mit drei unabhängigen Methoden nachgewiesen werden (s. Kap. 3.4.1.1 und 3.4.1.2). Durch die Quantifizierung des Verhältnisses von *leader*-Transkript zur NP-mRNA (ca. 8.7-facher Überschuss von mRNA zu *leader*-Transkript) konnte gezeigt werden, dass die zellulären Spiegel des *leader*-Transkriptes substanziell sind, was eine mechanistische und/oder regulatorische Rolle nahelegt.

Die mögliche funktionelle Rolle solcher *leader*-Transkripte wurde schon detailliert bei Viren der Familien der Paramyxoviren (z.B. RSV) und der Rhabdoviren (z.B. VSV) untersucht. Hierbei wurde u.a. folgendes Modell postuliert: der Wechsel von Replikation zu Transkription wird maßgeblich von der Verfügbarkeit des Nukleoproteins (N) beeinflusst; solange nicht genügend N für die Enkapsidierung der neu synthetisierten Antigenom- bzw. Genomstränge (während der Replikation) vorliegt, wird zunächst transkribiert (= primäre Transkription). In diesem Status werden kurze (20-50 nt) *leader*-Transkripte synthetisiert, die jedoch aufgrund des Mangels an N nicht enkapsidiert werden. Der Polymerase-Komplex erkennt ein Terminationssignal in der Nähe des ersten Transkriptionsstartes, entlässt das kurze *leader*-Transkript, um dann am Genstartpunkt zu reinitiiieren und mit der Synthese der mRNA zu beginnen. Wenn genügend N hergestellt wurde, wird die antigenomische *leader*-Region im Verlauf der Transkription sofort enkapsidiert, weshalb das Terminationssignal nicht erkannt wird, der Polymerase-Komplex in seinem replikativen Modus gelangt und Volllängen-Antigenom synthetisiert. Demnach fungiert das *leader*-Transkript als Replikations-„Sensor“, da es bei ungenügender Nukleoprotein-Menge zum Abbruch der Synthese führt und somit den Replikationsmodus unterdrückt [126,127].

Auch im Ebolavirus könnte das *leader*-Transkript eine ähnliche Funktion besitzen. Das ermittelte Verhältnis von mRNA zu *leader*-Transkript könnte darauf hindeuten, dass die Transkription des Ebolavirus-Genoms am 3'-Ende startet und mit der Synthese des *leader*-Transkriptes (analog dem oben beschriebenen Modell) beginnt. Da dieses wahrscheinlich nicht enkapsidiert wird, unterliegt es zumindest teilweise dem Abbau durch zelluläre Nukleasen, was den Überschuss im Vergleich zur mRNA erklären würde. Diese Hypothese muss allerdings experimentell noch evaluiert werden (s. Ausblick).

3.4.2 Einfluss von genomischen Mutationen und der Präsenz von VP30 auf das virale Transkriptom unter Verwendung des Minigenom-Systems

In einer Studie von Weik *et al.* konnte gezeigt werden, dass die VP30-Abhängigkeit der Transkription von der Haarnadelstruktur an Position 56-78 abhängt. Durch Einführen mehrerer Mutationen, die zur Generierung einer Schnittstelle für das Restriktionsenzym *NheI* führten (im Folgenden als *NheI*-Mutante bezeichnet) konnte diese Abhängigkeit aufgehoben werden ([94], s. Abb. 66). Um die genauen mechanistischen Hintergründe zu verstehen, wurde ein *Deep Sequencing* durchgeführt, bei dem Proben auf Basis des Minigenom-Systems hergestellt wurden, wobei jeweils Gesamt-RNA sowie kleine RNAs (< 200 nt) isoliert wurden (durchgeführt von Dr. Nadine Biedenkopf; AG Becker). Die RNA-Proben wurden aus Zellen isoliert, die mit dem Wildtyp-Minigenom (WT) oder dem *NheI*-mutierten Minigenom (*NheI*) transfiziert worden waren, wobei in den Zellen jeweils VP30 koexprimiert oder weggelassen wurde.

3.4.2.1 Analyse des viralen Transkriptoms auf Basis des Minigenoms über NGS

Vor der Durchführung des *Deep Sequencing* wurde die Transkriptionsaktivierung des *NheI*-mutierten Minigenoms mit und ohne VP30 im Vergleich zum Wildtyp-Minigenom untersucht (durchgeführt von Dr. Nadine Biedenkopf; AG Becker). Im Gegensatz zu den bereits publizierten Daten, die auf Messung der CAT-Aktivität beruhten, wurde bei den hier vorgestellten Daten die Luziferase-Aktivität gemessen, die eine quantitative Aussage über die Transkriptionsaktivierung zulässt. Hierbei stellte sich heraus, dass die Transkription in den verschiedenen Ansätzen sehr unterschiedlich aktiviert wurde (s. Abb. 62).

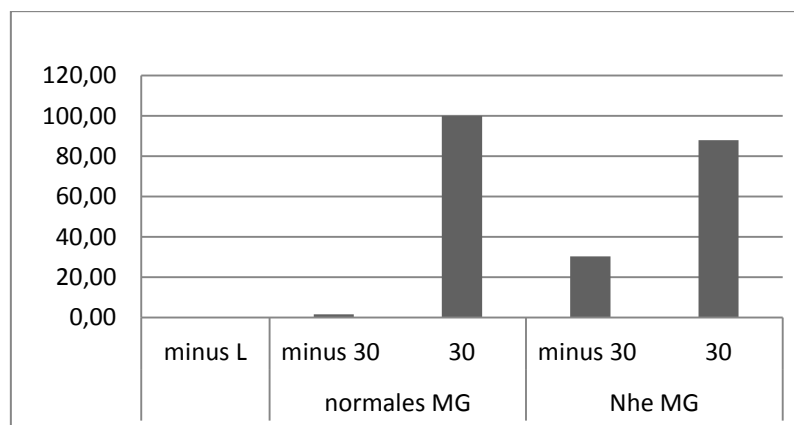


Abb. 62 Ergebnis des trVLP-Assays. Mit Hilfe des Minigenom-Systems wurde die Transkriptionsaktivierung mittels Luziferase bestimmt. Als Kontrollen wurden Zellen verwendet, in denen entweder keine Polymerase (L; = minus L) oder kein VP30 (= minus 30) koexprimiert wurde; die Transkriptionsaktivierung unter Verwendung des normalen Minigenoms in Gegenwart von VP30 wurde auf 100 gesetzt. Bei Verwendung des mutierten Minigenoms (= *Nhe MG*) konnte mit VP30 eine leicht verminderte Transkriptionsaktivierung festgestellt werden. Auch ohne VP30 wurde im Fall des *Nhe MG* eine Transkriptionsaktivierung gemessen, die jedoch unterhalb der beiden Proben mit VP30 lag [Abb. von Dr. Nadine Biedenkopf].

Während die Transkription des Wildtyp-Minigenoms und des NheI-Minigenoms in Anwesenheit von VP30 ähnlich stark aktiviert wurde, konnte im Ansatz des Minigenoms ohne VP30 keine Transkription mehr nachgewiesen werden. Im Ansatz des NheI-Minigenoms ohne VP30 konnte ebenfalls eine Aktivierung der Transkription nachgewiesen werden, die jedoch niedriger als in den Ansätzen mit VP30 war. Dies stimmt mit den bereits publizierten Daten von Weik *et al.* überein [94].

Bei der vergleichenden *Deep Sequencing* Analyse der vier Bibliotheken für kleine RNAs wurden Unterschiede, aber auch Gemeinsamkeiten zwischen den Bibliotheken bemerkt (s. Abb. 63). Auffallend war vor allem, dass sich jeweils die beiden Proben mit VP30 (blau) sowie die beiden ohne VP30 (rot) ähnelten. WT und NheI zeigten in Anwesenheit von VP30 eine sehr geringe Anzahl von *Reads* für *leader*-Transkripte, während in beiden VP30-defizienten Proben eine höhere und vergleichbare Anzahl an *leader*-Transkripten (~60 *Reads*) gefunden wurde. Hierbei lag die durchschnittliche Abbruchposition bei Nukleotid 74 (also im 3'-Bereich des Haarnadelstamms auf mRNA-Ebene), wobei die *leader*-Transkripte der NheI-mutierten Probe eine leichte Tendenz zu einem geringfügig späteren Abbruch zeigten, was wiederum auf die Manipulation in der Haarnadelregion zurückgeführt werden kann.

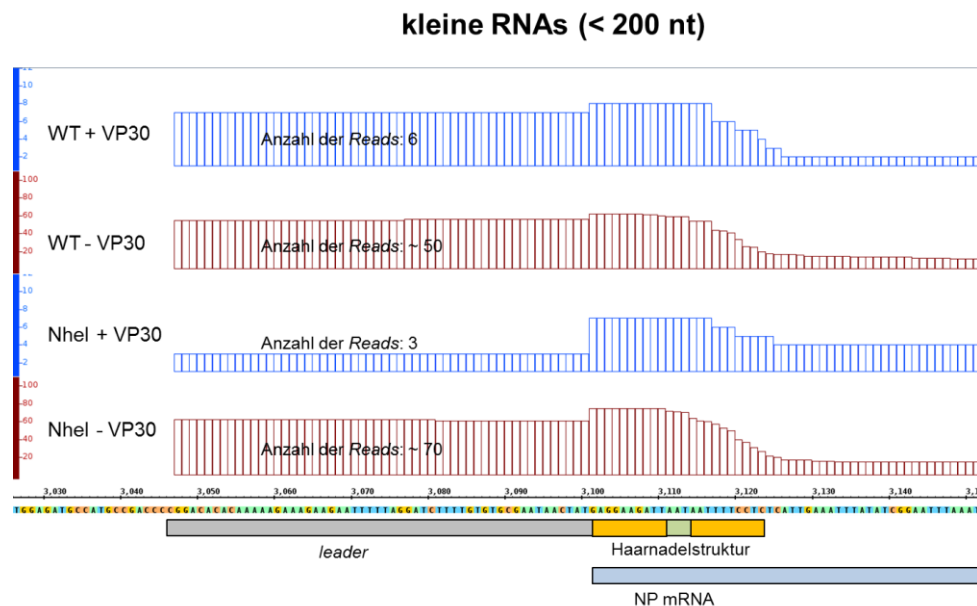


Abb. 63 Übersicht zu den Ergebnissen des NGS der kleinen RNA-Bibliotheken der verschiedenen Minigenom-Ansätze. Es wurden das Wildtyp-Minigenom (WT) in An- und Abwesenheit von VP30 untersucht sowie das NheI-mutierte Minigenom (NheI) ebenfalls in An- und Abwesenheit von VP30. Die beiden Bibliotheken aus Zellen, die VP30 exprimierten (blau) zeigten eine nur sehr geringe Menge an *leader*-Transkripten, während die Proben aus Zellen ohne VP30-Expression (rot) eine ähnlich große Menge an *leader*-Transkripten (~60 *Reads*) enthielten. Die Angabe der maximalen Reads bezieht sich auf die größte Anzahl an *Reads*, die in der Region von nt 1-55 starten.

Das bedeutet, dass die Anzahl bzw. die Häufigkeit der *leader*-Transkripte von der An- bzw. Abwesenheit von VP30 abhängig ist und nicht maßgeblich von der eingeführten NheI-Mutation beeinflusst wird.

Beim Vergleich der vier Poly(A)-Bibliotheken konnten ebenfalls verschiedene Auffälligkeiten festgestellt werden (s. Abb. 64). Während das qualitative Transkriptionsmuster in den vier Bibliotheken vergleichbar war, wurden vor allem bezüglich der Transkriptionseffizienz (gemessen an der Summe der mRNA-Reads) deutliche Unterschiede festgestellt. Im WT konnte in Anwesenheit von VP30 eine markante mRNA-Synthese nachgewiesen werden, die ca. 25-fach stärker war als in Abwesenheit von VP30. Obwohl im Luziferase-basierten Minigenom-System in Abwesenheit von VP30 bisher keine Transkription mehr detektierbar war (s. Abb. 62), so konnte hier durch die Sensitivität des NGS eine basale, wenn auch vergleichsweise schwache Transkription ohne VP30 detektiert werden, die dokumentiert, dass VP30 nicht absolut essenziell für die Transkription ist.

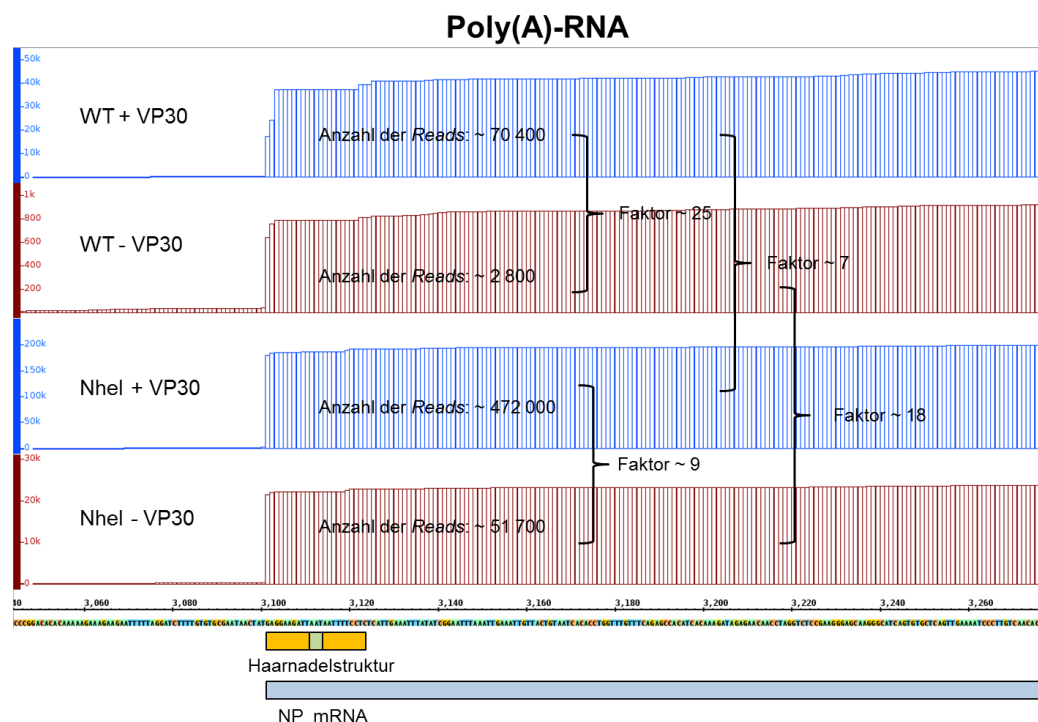


Abb. 64 Übersicht zu den Ergebnissen des NGS der Poly(A)-RNA-Bibliotheken verschiedener Minigenom-Ansätze. Es wurden sowohl das Wildtyp-Minigenom (WT) als auch das NheI-mutierte Minigenom (NheI) in An- und Abwesenheit von VP30 untersucht. Die jeweiligen Bibliotheken in Anwesenheit von VP30 sind blau, in Abwesenheit von VP30 sind rot dargestellt. Beim Vergleich der Startpositionen der mRNA wurden bei WT + VP30 nt 56-58 verwendet, während sich ohne VP30 die Präferenz zu nt 56 verschob; bei den mutierten Minigenom-Daten konnte eine fast ausschließliche Initiation an Position 56 beobachtet werden. Die Effizienz der Transkriptionsinitiation war bei WT – VP30 am schwächsten, konnte aber durch die Einführung der NheI-Mutation (NheI – VP30) stark gesteigert werden. Am effizientesten war die Transkription bei NheI + VP30. Die Anzahl der Reads entsprach der Summe der Reads, die auf die mRNA passten, die wiederum auf die gesamte Read-Anzahl innerhalb der Bibliothek normiert wurde.

Die RNA-Bibliothek des Nhel-Minigenoms ohne VP30 beinhaltete mRNA-Transkripte, die die Anzahl der mRNA-Reads der WT-Probe ohne VP30 um das ca. 18-fache überstiegen. Das bedeutet, dass die Einführung der Nhel-Mutation die VP30-unabhängige Transkription stark stimulierte, was die bereits erwähnten Ergebnisse aus der Studie von Weik *et al* [94] sowie die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten zur Transkriptionsaktivierung (s. Abb. 62) bestätigt. In der Probe des Nhel-Minigenoms mit VP30 wurden mit Abstand die meisten Reads gefunden (ca. Faktor 9 im Vergleich zu Nhel ohne VP30; ca. Faktor 7 im Vergleich zu WT mit VP30).

Interessanterweise konnte eine Variation des Transkriptionsstart-Nukleotids bei WT mit VP30 gezeigt werden: ähnlich wie bereits im Fall der EBOV-infizierten Zellen wurde offenbar auch im Minigenom-System neben Position 56 an den Positionen 57 und 58 initiiert. Dagegen ist der Transkriptionsstartpunkt der Nhel-mutierten Proben sehr definiert und beinahe ausschließlich an Position 56 zu finden, unabhängig von der An- oder Abwesenheit von VP30 (s. Abb. 64).

Bemerkenswert war hierbei die Tatsache, dass der Polymerase-Komplex auch ohne VP30 die korrekte Startposition findet und damit die Transkription unabhängig von VP30 an der korrekten Position initiieren kann.

Die vergleichende Analyse der Transkriptionsinitiation deutete darauf hin, dass sowohl die Nhel-Mutation als auch die Anwesenheit von VP30 die Transkription positiv beeinflussen, wobei die Wirkung dieser beiden Faktoren unabhängig voneinander aufzutreten scheint.

3.4.2.2 Bindungsuntersuchung von VP30 an Nhel-mutierte RNA-Substrate

Durch Einführung der Nhel-Mutation in das Minigenom konnten starke Effekte auf (i) die VP30-Abhängigkeit der Transkription sowie (ii) die Transkriptionseffizienz beobachtet werden. Im Hinblick auf die VP30:RNA-Bindung war die Klärung der Frage von Interesse, ob die Nhel-Mutation die Affinität von VP30 zur RNA beeinflusst. Aus diesem Grund wurde diese Mutation sowohl in das genomische Substrat 154-1 als auch in das antigenomische Substrat 2-158 eingeführt (s. Abb. 66 A). Die Nhel-Mutation, die aus sieben Punktmutationen im Bereich der Positionen 69 bis 77 besteht, verändert die Haarnadelstruktur auf genomischer und antigenomischer Ebene ohne die konservierten Nukleotide der Transkriptionsstartregion zu betreffen. Die Vorhersage der Sekundärstruktur der beiden mutierten Substrate deutete Veränderungen in der Position der Haarnadelstruktur als auch in deren Stabilität an (s. Abb. 65).

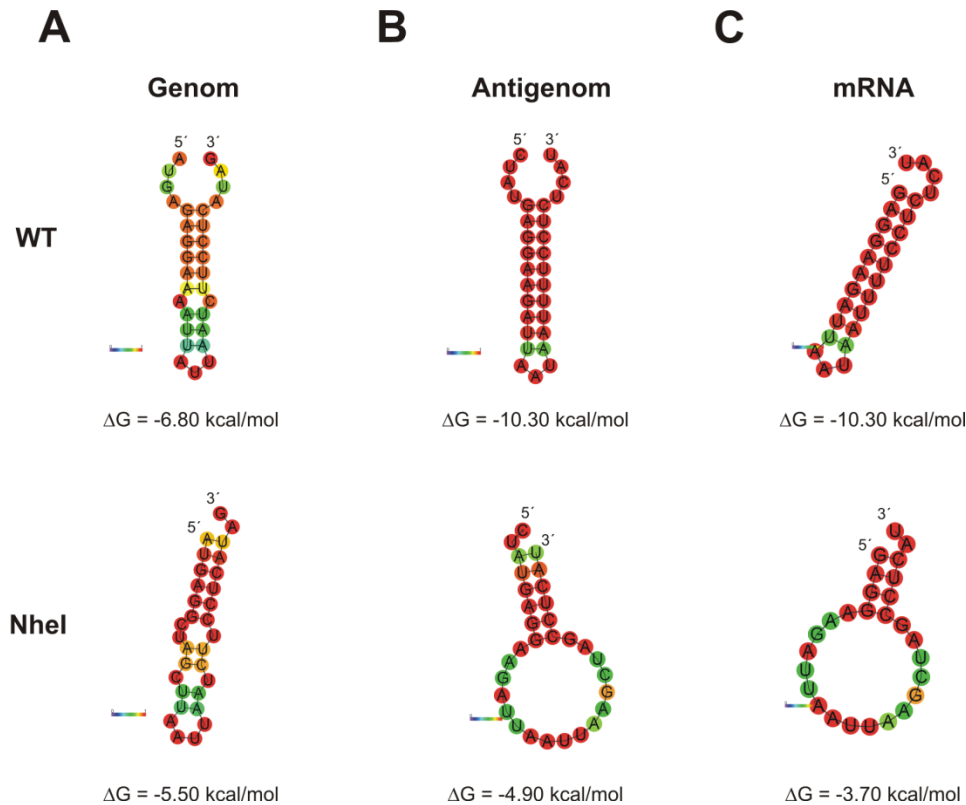


Abb. 65 RNA-Strukturvorhersagen (mittels *RNAfold*) für die Haarnadelstruktur (nt 56-78). **(A)** Vergleich der vorhergesagten Haarnadelstrukturen auf Genomebene WT vs. Nhel-mutierte Variante mit einem ΔG -Wert von -6.80 kcal/mol für WT und -5.50 kcal/mol für das Nhel-Substrat. **(B)** Vergleich der vorhergesagten Haarnadelstrukturen auf dem antigenomischen RNA-Strang; durch Einführen der Nhel-Mutation vermindert sich die Stabilität von -10.30 kcal/mol auf -4.90 kcal/mol. **(C)** Vergleich der vorhergesagten Haarnadelstrukturen für den 5'-terminalen Bereich der mRNA; auch hierbei wird die Stabilität stark reduziert (von -10.30 kcal/mol auf -3.70 kcal/mol); für die Vorhersagen wurden die MFE-Struktur mit Standardparametern zugrunde gelegt, es wurden stets die Nukleotide 52-82 verwendet, um die Umgebung der Haarnadel zu berücksichtigen (Ausnahme war der Vergleich der mRNA-Strukturen mit nt 56-82).

Die Wildtyp-Haarnadelstruktur umfasst auf Genomebene Nukleotide 56-78 ($\Delta G = -6.80$ kcal/mol), während in der Nhel-mutierte Version die Struktur leicht verlagert ist und die Nukleotide 54-82 einbezieht ($\Delta G = -5.50$ kcal/mol; s. Abb. 65 A). Bei der Kalkulation der Stabilität für die antigenomische Haarnadelstruktur liegt die Stabilität der WT-Version bei -10.30 kcal/mol, während im Nhel-mutierte RNA-Substrat die Haarnadelstruktur leicht verlagert wurde (nt 54-82; $\Delta G = -4.90$ kcal/mol; s. Abb. 65 B). Auf mRNA-Ebene wird der destabilisierende Effekt der Nhel-Mutation weiter verstärkt und auf einen ΔG -Wert von -3.80 kcal/mol reduziert (s. Abb. 65 C). Strukturbasiert wurde durch die Nhel-Mutation demnach eine Destabilisierung der Haarnadelstruktur vor allem auf antigenomischer bzw. mRNA-Ebene erreicht.

A

nt	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78
wt	A	U	A	A	U	U	U	U	C	C	U	C
NheI	A	U	U	A	A	G	C	U	A	G	C	C

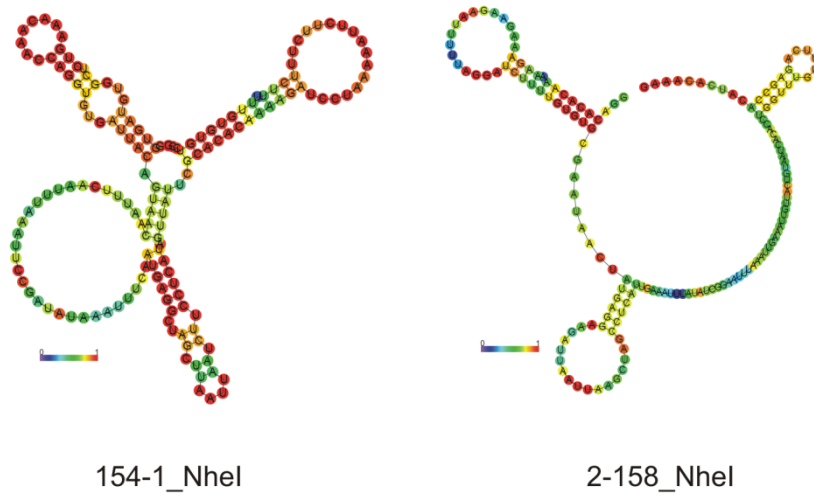
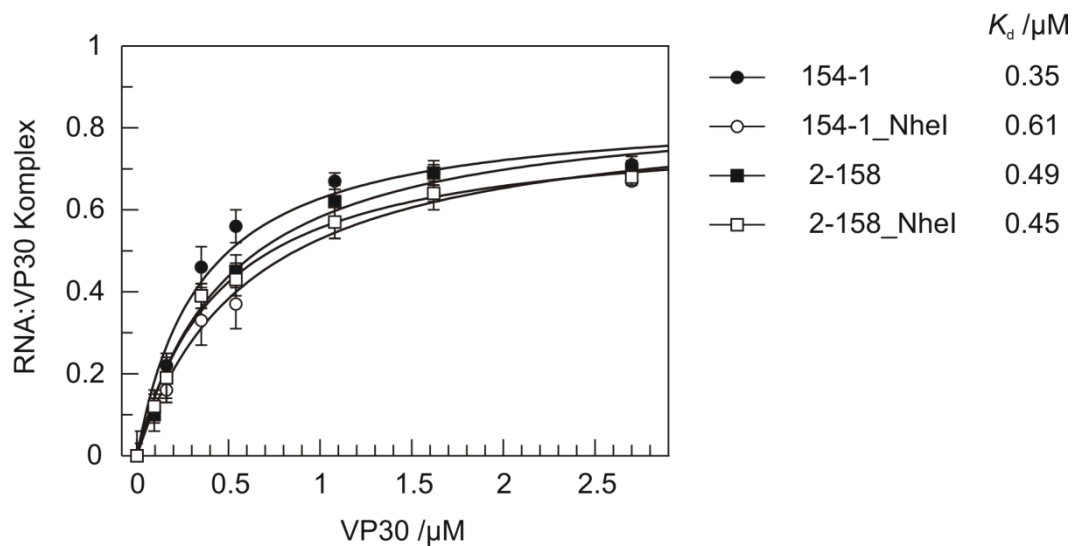
B**C**

Abb. 66 RNA-Bindungsuntersuchung der NheI-Mutanten. **(A)** Die Positionen der NheI-Punktmutationen gezeigt auf Plusstrang-Ebene sind in Rot hervorgehoben (NheI-Erkennungssequenz: GCTAGC). **(B)** Sekundärstrukturvorhersagen der NheI-mutierten Substrate 154-1 und 2-158 mittels *RNAfold*; der Farbcode spiegelt die Wahrscheinlichkeit des gepaarten oder ungepaarten Zustands wider (rot = hohe, blau = niedrige Wahrscheinlichkeit). **(C)** Ergebnis der RNA-Bindungsstudie mittels EMSA. Für die antigenomische Variante konnte kein Einfluss der NheI-Mutation auf die Bindungsaffinität nachgewiesen werden, während das genomische Substrat eine Reduktion der Affinität um den Faktor 1.7 zeigte.

Die Affinitäten von VP30 zu diesen Substraten zeigten im Fall des antigenomischen Substrates keine Veränderung der Affinität, im Fall der genomischen Nhel-RNA eine leichte Abschwächung in der RNA-Bindung um den Faktor 1.7.

Da in der vorangegangenen RNA-Substrat-Analyse (s. Kap. 3.2) beobachtet wurde, dass die Haarnadelstruktur die Affinität zu VP30 begünstigt, jedoch unerheblich ist, ob es sich um die Haarnadel auf (+)- oder (-)-RNA-Ebene handelt, konnte davon ausgegangen werden, dass die Affinität von VP30 zur RNA stabil gegenüber Veränderungen in der Haarnadelstruktur bleiben sollte, solange weiterhin eine Haarnadelstruktur vorhanden ist. Daher war es nicht unerwartet, dass die eingeführten Mutationen in der Haarnadelstruktur tatsächlich keinen starken Bindungsphänotyp hervorriefen.

3.4.2.3 Zusammenfassung und physiologische Interpretation der Ergebnisse

Ausgehend von den publizierten Ergebnissen von Weik *et al.* konnte die Detektion einer VP30-unabhängigen Transkription bei Einführung der Nhel-Mutation sowohl durch einen Luziferase-basierten trVLP-Assay als auch durch die erhaltenen NGS-Daten bestätigt werden. Der hier gezeigte Trend, dass die mRNA-Initiation sowohl durch VP30 als auch durch die Nhel-Mutation stimuliert wird und die Kombination beider Faktoren (Probe: Nhel + VP30) die Transkription maximal stimuliert, deutete sich bereits in den Northern Blot-Analysen von Weik *et al.* an (s. Fig. 5 in [94]).

Da die Nhel-Mutation sich nicht in der Transkriptionsstartregion, sondern sich strukturell gesehen auf der gegenüberliegenden Seite des Haarnadelstammes befindet, liegt die Vermutung nahe, dass dem Effekt auf die Transkriptionsinitiation und VP30-Abhängigkeit eine strukturelle (und weniger sequenzspezifische) Ursache zugrunde liegt. Sekundärstrukturvorhersagen zeigten, dass durch die Nhel-Mutation vor allem die Position und die Stabilität der Haarnadel beeinflusst werden, was jedoch die Synthese des *leader*-Transkriptes sowie das Transkriptionsmuster (qualitativ betrachtet) nicht wesentlich beeinflusste (s. Abb. 63 und Abb. 64).

In erster Linie beeinflusste die Mutation (wie auch die An- und Abwesenheit von VP30) die Effizienz der Transkription. Der Effekt war am prägnantesten, wenn man die beiden Faktoren (Nhel-Mutation und VP30) unabhängig voneinander betrachtet: so führte bei Abwesenheit der Nhel-Mutation die Präsenz von VP30 zu einer 25-fachen Transkriptionsstimulation (WT + vs. – VP30) und das Einführen einer Nhel-Mutation in Abwesenheit von VP30 zu einer 19-fachen Transkriptionsstimulation (WT –VP30 vs. Nhel – VP30). Kamen beide Faktoren zusammen konnten die Effekte in abgeschwächter Form nachvollzogen werden, was heißt, dass sich die Effekte nicht gegenseitig addieren oder gar verstärken: in Anwesenheit von VP30 führte die Nhel-Mutation zu einer 7-fachen Steigerung (WT + VP30 vs. Nhel +VP30),

im Fall der NheI-Mutation konnte VP30 die Transkription noch um das 9-fache stimulieren (NheI + VP30 vs. NheI – VP30). Interessanterweise erscheinen die Effekte bei beiden Betrachtungsweisen in einer ähnlichen Größenordnung (25; 19-fach bzw. 7;9-fach) zu liegen.

Mechanistisch könnten die hier vorgestellten Daten folgendermaßen gedeutet werden: Die Einführung der NheI-Mutation führt zu einer dramatischen Schwächung der Haarnadelstruktur auf mRNA-Ebene (ΔG : -3.70 kcal/mol bei Berücksichtigung der Nukleotidumgebung am 3'-Ende), die in ihrer Wildtypform in der Regel zu kurzen Abbruchtranskripten führen können, wie durch die Transkriptomdaten EBOV-infizierter Zellen impliziert (s. Kap. 3.4.1.1). Ist eine Haarnadelstruktur hinreichend instabil, kann die Transkription auch ohne VP30 erfolgen, wie schon im Fall der VP35 mRNA (Haarnadelstruktur am mRNA 5'-Ende: ΔG : -8.70 kcal/mol) beobachtet, was eben auch die mechanistische Konsequenz der NheI-Mutation in der ersten Sekundärstruktur des NP-Gens sein könnte. Die Abschwächung der Transkriptionsstimulation von VP30 im Fall der NheI-Mutation könnte zusätzlich dadurch verstärkt werden, dass eine leichte Abnahme der Bindungsaffinität zum Templatstrang (Genom) durch die NheI-Mutation hervorgerufen wurde (Faktor 1.7; s. Abb. 66).

Bei der Auswertung der Bibliotheken der kleinen RNAs konnte beobachtet werden, dass die Abwesenheit von VP30 zu einer ca. 10-fachen Steigerung der *leader*-Transkriptionsspiegel führte. Aufbauend auf der im vorherigen Kapitel vorgestellten Interpretation bzgl. der funktionellen Rolle dieses Transkripts, fügt sich diese Beobachtung in das vorgeschlagene Modell ein: so könnte die Polymerase grundsätzlich mit der RNA-Synthese am 3'-Ende des Genoms beginnen und die Transkription an der Haarnadelstruktur terminieren, um die Transkription der mRNA zu reinitiiieren. In Abwesenheit von VP30 ist die Effizienz der Transkriptionsinitiation geringer, was mit der wiederholten Initiation am 3'-Ende des Genoms und der damit verstärkten Transkription des *leaders* einhergehen könnte.

Bei der Interpretation der Minigenom-Daten muss bedacht werden, dass hierbei alle viralen Proteine durch Expressionsplasmide in ausreichenden Mengen angeboten werden und direkt die Phase der Replikation und sekundären Transkription beginnen kann. Der Grund für die vermehrte Produktion des *leader*-Transkriptes kann deshalb nicht fehlendes NP sein, sondern scheint, wie oben erwähnt, auf die An- bzw. Abwesenheit von VP30 zurückführbar zu sein.

Zusammenfassend kann aus den Daten ein mechanistisches Modell postuliert werden, in dem der Einfluss von VP30 auf die Transkriptionsregulation differenziert betrachtet wird (s. Abb. 67). In Anwesenheit von VP30 (obere Hälfte von Abb. 67) wird die Transkription am 3'-terminalen Ende des Genoms initiiert, was zur Synthese des *leader*-Transkriptes führt. Nach

Abbruch der Transkription an der Haarnadelstruktur (nt 56-78) wird bevorzugt die Transkription der ersten mRNA reinitiiert. In einem solchen Szenario kommt es zu einer effizienten mRNA-Synthese.

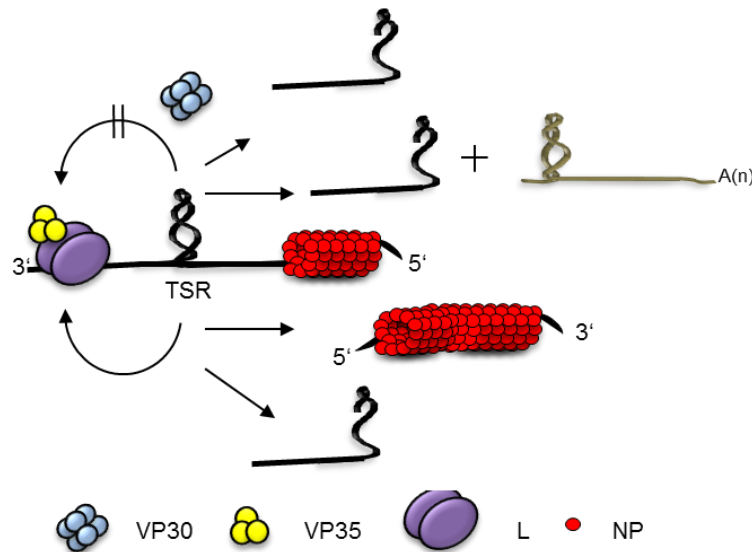


Abb. 67 Modell zur transkriptionellen Regulation von VP30 auf Basis der NGS-Daten. In Anwesenheit von VP30 (blau) startet der Polymerasekomplex (L = violett; VP35 = gelb) die Transkription am 3'-terminalen Ende des Genoms mit der Synthese des *leader*-Transkriptes. In diesem Szenario wird bevorzugt nach Abbruch des Transkriptes an der Haarnadel (nt 56-78) die Synthese der ersten mRNA (NP) initiiert. In Abwesenheit von VP30 findet präferenziell Replikation statt; zusätzlich konnte eine Akkumulation des *leader*-Transkriptes in Abwesenheit von VP30 beobachtet werden; dies könnte bedeuten, dass der Polymerasekomplex eine Art *idling cycle* durchläuft und vermehrt am 3'-Ende initiiert, da die Aktivierung zur Transkription der ersten mRNA fehlt.

In Abwesenheit von VP30 (untere Hälfte von Abb. 67) wird verstärkt repliziert und *leader*-RNA transkribiert. Letzteres könnte so begründet werden, dass der Polymerase-Komplex aufgrund von fehlendem VP30 nicht mehr effizient die mRNA-Synthese initiieren kann und daraufhin eine Art *idling cycle* durchläuft, der nach erneuter Initiation am 3'-terminalen Ende die Synthese weiterer *leader*-Transkripte bedeuten würde. Dies würde die beobachtete Akkumulation von *leader*-Transkripten in Abwesenheit von VP30 erklären (s. Abb. 63).

4 Ausblick

Auf Basis der hier vorgestellten Projekte konnte ein tiefergehendes Verständnis der RNA-Bindungsaktivität von VP30 im Zusammenhang mit seiner Funktion als Transkriptionsfaktor gewonnen werden.

Es blieben alte und ergeben sich neue Fragen, die in Zukunft adressiert werden müssen und für deren Bearbeitung nun einige mögliche Perspektiven diskutiert werden sollen.

4.1 Bestimmung der authentischen RNA-Bindungsstelle von VP30

In der hier vorgestellten *in vitro* Charakterisierung der RNA-Bindungsaktivität konnten einige Charakteristika und Spezifitätsmerkmale der VP30:RNA-Bindung aufgezeigt werden (s. Kap. 3.2). Zusätzlich gelang es erstmals einen physiologischen Zusammenhang zwischen RNA-Bindung und Transkriptionsregulation experimentell zu dokumentieren (s. Kap. 3.3).

Dennoch konnte nicht abschließend geklärt werden, wo die authentische Bindungsstelle von VP30 liegt. Die *in vitro* herausgearbeiteten Strukturerefordernisse der VP30:RNA-Interaktion beinhalteten keine spezifischen Sequenzmotive, die von VP30 erkannt werden und vor allem der virale Kontext (Enkapsidierung und Beteiligung weiterer viraler oder zellulärer RNA-bindender Proteine) konnte bisher nicht berücksichtigt werden.

Ein Ansatz zur Adressierung dieser Fragestellung sind iCLIP (engl.: *individual-nucleotide resolution Cross-Linking and Immunoprecipitation*)-Experimente mit VP30, was bereits aktueller Gegenstand der Forschung ist. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die RNA-Bindungsstellen eines Proteins (auf Basis einer vorhergehenden kovalenten Verknüpfung des Proteins mit der RNA) mit Einzelnukleotid-Auflösung bestimmt werden können. Diese Experimente können *in vitro* mit einigen der hier gezeigten RNA-Substrate durchgeführt werden, um zu klären, ob VP30 eine definierte einzelne Bindestelle oder, was die wahrscheinlichere Variante ist, mehrere Bindestellen an einem RNA-Substrat besitzt. Um eine authentische Situation zu untersuchen ist es ebenfalls naheliegend das Minigenom-System als Grundlage von iCLIP-Experimenten zu verwenden, da hier die Möglichkeit besteht die VP30-Bindung im Kontext authentischer Viruspartikel zu lokalisieren.

Ein alternativer Ansatz, der in Betracht gezogen werden könnte, ist der Kristallisationsversuch von VP30 evtl. im Komplex mit RNA. Bisher konnte nur der C-terminale Bereich von VP30 (aa 142-272) strukturell aufgeklärt werden, was vor allem an der sehr geringen Löslichkeit des Vollängen-VP30 liegen könnte. Da VP30 als MBP-Fusionsprotein aufgereinigt und der MBP-tag mittels TEV-Protease abgespalten werden kann, könnte eine darauf basierende Aufreinigungsprozedur versucht werden. Aufgrund der

sehr unterschiedlichen isoelektrischen Punkte von VP30 (pI: 9.0) und MBP (pI: 5.0) könnten diese beiden Spaltprodukte über einen Ionentauscher voneinander getrennt werden. Um die Stabilität des N-terminalen Bereiches von VP30 zu erhöhen, könnten virale RNAs als Bindungspartner hinzugefügt werden. Das so aufgereinigte VP30 (ohne *tag*) mit oder ohne authentische virale RNA könnte ein erster Ansatzpunkt für Kristallisationsversuche sein.

4.2 Untersuchung der funktionellen Rolle des *leader*-Transkriptes

Im Rahmen dieser Arbeit ist es erstmals gelungen ein *leader*-Transkript des Ebolavirus experimentell nachzuweisen. Mit der Analyse der erhaltenen Daten deutete sich die mögliche Rolle eines solchen *leader*-Transkriptes an, die analog zu der in anderen Viren (z.B. VSV und RSV) sein könnte.

Dabei würde der *leader* transkribiert werden und der Polymerase-Komplex an einem Terminationssignal nahe der Transkriptionsstartregion des ersten Gens die RNA-Synthese abbrechen. Diese Termination könnte die Konsequenz mangelnder Verfügbarkeit von NP sein und somit dafür sorgen, dass keine vorzeitige Replikation stattfindet. Für VSV konnte gezeigt werden, dass sich innerhalb dieses *leaders* das Signal für die Enkapsidierung befindet und somit das *leader*-Transkript zum Teil nachträglich enkapsidiert vorliegen kann und mit fortschreitender Infektionsdauer akkumuliert [126].

Mögliche Ansätze zur genaueren Untersuchung dieses *leader*-Transkriptes *in vivo* könnten demnach Aufschluss über die genaue funktionelle Rolle geben. Zunächst wäre es daher sinnvoll nachzuvollziehen, ob das *leader*-Transkript tatsächlich ein Produkt der Transkription darstellt. Hierfür würde sich das replikations-defiziente Minigenom-System anbieten, das aufgrund einer Deletion der 5'-*trailer*-Region die spezifische Untersuchung von Transkriptionseffekten ermöglicht [88]. Anschließend könnte die funktionelle Rolle des *leader*-Transkriptes mit Hilfe einer *antisense*-Strategie untersucht werden. Hierfür könnte z.B. ein DNA/LNA-Mixer verwendet werden, das an das *leader*-Transkript hybridisieren kann. Durch Blockade des *leader*-Transkriptes könnten möglicherweise Effekte auf die Transkription oder Replikation ausgelöst werden, die auf diese Weise identifiziert werden könnten. Ein Nebeneffekt bestünde jedoch darin, dass dieses Oligonukleotid auch an das Antigenom binden kann, das ja ein Zwischentemplet der Replikation darstellt. Um diese Effekte auszudifferenzieren und in erster Linie den Einfluss auf die Transkription zu evaluieren, könnte erneut auf ein replikations-defizientes Minigenom-System ausgewichen werden [88].

Da nach dem aktuellen Modell der Wechsel zwischen Transkription und Replikation stark von der verfügbaren Menge an NP abhängt, könnte dies ebenfalls ein interessanter Ansatzpunkt sein. Normalerweise werden im Minigenom-System alle viralen Proteine Plasmid-kodiert zur Verfügung gestellt und liegen demnach in großen Mengen vor. In den so

genannten Synthese-Zellen findet somit sofort Replikation und sekundäre Transkription statt, was dem Status einer späten Infektion entspricht. Mit den dort gebildeten *virus-like-particles* (VLPs) können neue Zellen infiziert werden (Indikator-Zellen), in denen primäre Transkription unter stark limitierten Proteinbedingungen stattfindet. In den Indikatorzellen würde man also eine hohe Produktion an *leader*-Transkripten erwarten, da hier keine *de novo* NP-Synthese mehr möglich ist. Interessant könnte also der Vergleich der Produktion des *leader*-Transkriptes in Synthese- vs. Indikatorzellen sein, da diese (wie oben erwähnt) verschiedene Phasen der Infektion repräsentieren. Durch die so erhaltenen Ergebnisse könnten das vorgeschlagene Modell überprüft, modifiziert und erweitert werden.

4.3 Untersuchung der Haarnadelstrukturen des Ebolavirus

Bei der Analyse der *Deep Sequencing* Daten fanden sich starke Hinweise auf die Ausbildung der Haarnadeln *in vivo*, vermutlich auf Antigenom-Ebene mit einer Terminator-ähnlichen Wirkung. Auch eine Ausbildung auf Genomebene ist unter bestimmten Umständen denkbar (s. Kap. 3.4.1.1). Ob die Ausbildung und damit Wirkung der Haarnadelstrukturen an den verschiedenen Genen sowie im Fall einer NheI-Mutation auf Genom- oder Antigenomebene (oder auf beiden Ebenen) stattfindet, könnte Gegenstand zukünftiger Projekte sein.

Eine solche Analyse wäre zum Beispiel möglich, indem die Sequenzen der Haarnadelstrukturen der verschiedenen Gene in das Minigenom (anstelle der NP-Haarnadel) eingebracht werden und die Effizienz der Transkription bestimmt würde. Damit könnte man eine quantitative Aussage über (i) die Transkriptionseffizienz der einzelnen mRNAs und (ii) über die Terminationsstärke der einzelnen Haarnadelstrukturen treffen.

Anschließend könnten die verschiedenen Haarnadelstrukturen durch eine gezielte Mutationsanalyse so verändert werden, dass sie auf Genomebene stabiler und auch gleichzeitig auf Antigenomebene instabiler werden und umgekehrt. Ein solch gegenläufiger Einfluss auf die Stabilitäten kann vor allem durch die strategische Positionierung von G:U-Basenpaaren erreicht werden. Der Effekt dieser Veränderungen auf die Transkription kann anschließend über die Expression der Luziferase quantifiziert werden.

Mit solch einer umfassenden Analyse sollten der Einfluss der Sekundärstrukturen sowie auch die Strangspezifität ihrer Wirkung *in vivo* aufgeklärt werden können.

5 Literaturverzeichnis

- [1] Kuhn J.H., B  o Y., Bavari S., Becker S., Bradfute S., Brauburger K., Rodney Brister J., Bukreyev A.A., Cai Y., Chandran K., Davey R.A., Dolnik O., Dye J.M., Enterlein S., Gonzalez J.P., Formenty P., Freiberg A.N., Henysley L.E., Hoenen T., Honko A.N., Ignatyev G.M., Jahrling P.B., Johnson K.M., Klenk H.D., Kobinger G., Lackemeyer M.G., Leroy E.M., Lever M.S., Mühlberger E., Netesoy S.V., Olinger G.G., Palacios G., Patterson J.L., Paweska J.T., Pitt L., Radoshitzky S.R., Ryabchikova E.I., Saphire E.O., Shestopaliv A.M., Smither S.J., Sullivan N.J., Swanepoel R., Takada A., Towner J.S., Virus nomenclature below the species level: a standardized nomenclature for filovirus strains and variants rescued from cDNA. *Arch Virol* **2014**; 159(5):1229-37.
- [2] Modrow S., Falke D., Truyen U., Sch  tzel H., Molekulare Virologie; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 3. Auflage **2010**.
- [3] Negredo A., Palacios G., Vázquez-Mor  n S., González F., Dopazo H., Molero F., Juste J., Quetglas J., Savji N., de la Cruz Martínez M., Herrera J.E., Pizzaro M., Hutchison S.K., Echevarría J. E., Lipkin W.I., Tenorio A., Discovery of an ebolavirus-like filovirus in europe. *PLoS Pathog* **2011**; 7(10):e1002304.
- [4] Siegert R., Shu H.L., Slenczka W., Peters D., M  ller G., On the etiology of an unknown human infection originating from monkeys. *Dtsch Med Wochenschr* **1967**; 92(51):2341-3. German.
- [5] WHO. Ebola haemorrhagic fever in Sudan, 1976. *Bull World Health Organ* **1978**; 56(2):247-70.
- [6] WHO. Ebola haemorrhagic fever in Zaire, 1976. *Bull World Health Organ* **1978**; 56(2): 271-93.
- [7] Cox N.J., McCormick J.B., Johnson K.M., Kiley M.P., Evidence for two subtypes of Ebola virus based on oligonucleotide mapping of RNA. *J Infect Dis* **1983**; 147(2):272-5.
- [8] Le Guenno B., Formenty P., Wyers M., Gounon P., Walker F., Boesch C., Isolation and partial characterisation of a new strain of Ebola virus. *Lancet* **1995**; 345(8960):1271-74.
- [9] Towner J.S., Sealy T.K., Khristova M.L., Albarino C.G., Conlan S., Reeder S.A., Quan P.L., Lipkin W.I., Downing R., Tappero J.W., Okware S., Lutwama J., Bakamutumaho B., Newly discovered ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in Uganda. *Plos Pathog* **2008**; 4(11):e1000212.
- [10] Jahrling P.B., Geisbert T.W., Dalgard D.W., Johnson E.D., Ksiazek T.G., Hall W.C., Peters C.J., Preliminary report: isolation of Ebola virus from monkeys imported to USA. *Lancet* **1990**; 335(8688):502-05.
- [11] Leroy E.M., Gonzalez J.P., Baize S., Ebola and Marburg haemorrhagic fever viruses: major scientific advances, but relatively minor public health threat for Africa. *Clin Microbiol Infect* **2011**; 17(7):964-76.
- [12] Shears P., O'Dempsey T.J., Ebola virus disease in Africa: epidemiology and nosocomial transmission. *J Hosp Infect* **2015** pii: S0195-6701(15)00046-8.
- [13] <http://apps.who.int/ebola/ebola-situation-reports>; aufgerufen am 01.10.15.
- [14] Leroy E.M., Kumulungui B., Pourrut X., Rouquet P., Hassanin A., Yaba P., D  licat A., Paweska J.T., Gonzalez J.P., Swanepoel R., Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* **2005**; 438(7068):575-6.
- [15] Dowell S.F., Mukunu R., Ksiazek T.G., Khan A.S., Rollin P.E., Peters C.J., Transmission of Ebola hemorrhagic fever: a study of risk factors in family members, Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. Commission de Lutte contre les Epid  mies    Kikwit. *J Infect Dis* **1999**; 179 Suppl 1: S87-91.
- [16] Leroy E.M., Epelboin A., Mondonge V., Pourrut X., Gonzalez J.P., Muyembe-Tamfum J.J., Formenty P., Human Ebola outbreak resulting from direct exposure to fruit bats in Luebo, Democratic Republic of Congo, 2007. *Vector Borne Zoonotic Dis* **2009**; 9(6):723-8.

- [17] Feldmann H., Geisbert T.W., Ebola haemorrhagic fever. *Lancet* **2011**; 377(9768):849-62.
- [18] Geisbert T.W., Hensley L.E., Larsen T., Young H.A., Reed D.S., Geisbert J.B., Scott D.P., Kagan E., Jahrling P.B., Davis K.J., Pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever in cynomolgus macaques: evidence that dendritic cells are early and sustained targets of infection. *Am J Pathol* **2003**; 163(6):2347-70.
- [19] Ryabchikova E.I., Kolesnikova L.V., Luchko S.V., An analysis of features of pathogenesis in two animal model of Ebola virus infection. *J Infect Dis* **1999**; 179 Suppl 1:S199-202.
- [20] Baskerville A., Fisher-Hoch S.P., Neild G.H., Dowsett A.B., Ultrastructural pathology of experimental Ebola haemorrhagic fever virus infection. *J Pathol* **1995**; 147(3):199-209.
- [21] Ströher U., West E., Bugany H., Klenk H.D., Schnittler H.J., Feldmann H., Infection and activation of monocytes by Marburg and Ebola viruses. *J Virol* **2001**; 75(22):11025-33.
- [22] Gupta M., Mahanty S., Ahmed R., Rollin P.E., Monocyte-derived human macrophages and peripheral blood mononuclear cells infected with ebola virus secrete MIP-1alpha and TNF-alpha and inhibit poly-IC-induced IFN-alpha in vitro. *Virology* **2001**; 284(1):20-5.
- [23] Baize S., Leroy E.M., Georges A.J., Georges-Courbot M.C., Capron M., Bedjabaga I., Lansoud-Soukate J., Mayoungou E., Inflammatory responses in Ebola virus-infected patients. *Clin Exp Immunol* **2002**; 128(1):163-8.
- [24] Wauquier N., Becquart P., Padilla C., Baize S., Leroy E.M., Human fatal zaire ebola virus infection is associated with an aberrant innate immunity and with massive lymphocyte apoptosis. *Plos Negl Trop Dis* **2010**; 4(10) pii: e837.
- [25] Villinger F., Rollin P.E., Brar S.S., Chikkala N.F., Winter J., Sundstorm J.B., Zaki S.R., Swanepoel R., Ansari A.A., Peters C.J., Markedly elevated levels of interferon (IFN)-gamma, IFN-alpha, interleukin (IL)-2, IL-10, and tumor necrosis factor-alpha associated with fatal Ebola virus infection. *J Infect Dis* **1999**; 179 Suppl 1:S188-191.
- [26] Feldmann H., Bugany H., Mahner F., Klenk H.D., Drenckhahn D., Schnittler H.J., Filovirus-induced endothelial leakage triggered by infected monocytes/macrophages. *J Virol* **1996**; 70(4):2208-14.
- [27] Ruf W., Emerging roles of tissue factor in viral hemorrhagic fever. *Trends Immunol.* **2004**; 25(9):461-4.
- [28] Geisbert T.W., Hensley L.E., Gibb T.R., Steele K.E., Jaax N.K., Jahrling P.B., Apoptosis induced in vitro and in vivo during infection by Ebola and Marburg viruses. *Lab Invest* **2000**; 80(2):171-186.
- [29] Reed D.S., Hensley L.E., Geisbert J.B., Jahrling P.B., Geisbert T.W., Depletion of peripheral blood T lymphocytes and NK cells during the course of ebola hemorrhagic Fever in cynomolgus macaques. *Viral Immunol* **2004**; 17(3):390-400.
- [30] Baize S., Leroy E.M., Georges-Courbot M.C., Capron M., Lansoud-Soukate J., Debré P., Fisher-Hoch S.P., McCormick J.B., Georges A.J., Defective humoral responses and extensive intravascular apoptosis are associated with fatal outcome in Ebola virus-infected patients. *Nat Med* **1999**; 5(4):423-6.
- [31] Ksiazek T.G., Rollin P.E., Williams A.J., Bressler D.S., Matrin M.L., Swanepoel R., Burt F.J., Leman P.A., Khan A.S., Rowe A.K. Mukunu R., Sanchez A., Peters C.J., Clinical virology of Ebola hemorrhagic fever (EHF): virus, virus antigen, and IgG and IgM antibody findings among EHF patients in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J Infect Dis* **1999**; 179 Suppl 1:177-87.
- [32] Cárdenas W.B., Loo Y.M., Gale M.Jr., Hartman A.L., Kimberlin C.R., Martínez-Sobrido L., Saphire E.O., Basler C.F., Ebola virus VP35 protein binds double-stranded RNA and inhibits alpha/beta interferon production induced by RIG-I signaling. *J Virol* **2006**; 80(11):5168-78.
- [33] Fabozzi G., Nabel C.S., Dolan M.A., Sullivan N.J., Ebolavirus proteins suppress the effects of small interfering RNA by direct interaction with the mammalian RNA interference pathway. *J Virol* **2011**; 85(6):2512-23.
- [34] http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/130997/1/WHO_HIS_KER_GHE_14.1_eng.pdf; aufgerufen am 10.08.15

- [35] Qiu X., Wong G., Audet J., Bello A., Fernando L., Alimonti J.B., Fausther-Bovendo H., Wei H., Aviles J., Hiatt E., Johnson A., Morton J., Swope K., Bohorov O., Bohorova N., Goodman C., Kim D., Pauly M.H., Velasco J., Pettitt J., Olinger G.G., Whaley K., Xu B., Strong J.E., Zeitlin L., Kobinger G.P., Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature* **2014**; 514(7520):47-53.
- [36] <https://clinicaltrials.gov> (Identifier: NCT02363322 und NCT02389192; aufgerufen am 09.09.15)
- [37] <https://clinicaltrials.gov> (Identifier: NCT0204175 und NCT01518881; aufgerufen am 09.09.15)
- [38] <http://www.vfa.de/de/arzneimittel-forschung/woran-wir-forschen/ebola-medikamente> (aufgerufen am 09.09.2015).
- [39] <https://clinicaltrials.gov> (Identifier: NCT02329054; aufgerufen am 09.09.15)
- [40] Geisbert T.W., Pushko P., Anderson K., Smith J., Davis K.J., Jahrling P.B., Evaluation in nonhuman primates of vaccines against Ebola virus. *Emerg Infect Dis* **2002**; 8(5):503-7.
- [41] Geisbert T.W., Jahrling P.B., Towards a vaccine against Ebola virus. *Expert Rev Vaccines* **2003**; 2(6):777-89.
- [42] Regules J.A., Beigel J.H., Paolino K.M., Voell J., Castellano A.R., Munoz P., Moon J.E., Ruck R.C., Bennett J.W., Twomey P.S., Gutierrez R.L., Remich S.A., Hack H.R., Wisniewski M.L., Joselyn M.D., Kwilas S.A., Van Deusen N., Mbaya O.T., Zhou Y., Stanley D.A., Bliss R.L., Cebrik D., Smith K.S., Shi M., Ledgerwood J.E., Graham B.S., Sullivan N.J., Jagodzinski L.L., Peel S.A., Alimonti J.B., Hooper J.W., Silvera P.M., Martin B.K., Monath T.P., Ramsey W.J., Link C.J., Lane H.C., Michael N.L., Davey R.T. Jr., Thomas S.J.; rVSVΔG-ZEBOV-GP Study Group., A Recombinant Vesicular Stomatitis Virus Ebola Vaccine – Preliminary Report. *N Engl J Med* **2015**; Epub ahead of print.
- [43] Agnandji S.T., Huttner A., Zinser M.E., Njuguna P., Dahlke C., Fernandes J.F., Yerly S., Dayer J.A., Kraehling V., Kasonta R., Adegnik A.A., Altfeld M., Auderset F., Bache E.B., Biedenkopf N., Borregaard S., Brosnahan J.S., Burrow R., Combescure C., Desmeules J., Eickmann M., Fehling S.K., Finckh A., Goncalves A.R., Grobusch M.P., Hooper J., Jambrecina A., Kabwende A.L., Kaya G., Kimani D., Lell B., Lemaître B., Lohse A.W., Massinga-Loembe M., Matthey A., Mordmüller B., Nolting A., Ogwang C., Ramharter M., Schmidt-Chanasit J., Schmiedel S., Silvera P., Stahl F.R., Staines H.M., Strecker T., Stubbe H.C., Tsofa B., Zaki S., Fast P., Moorthy V., Kaiser L., Krishna S., Becker S., Kieny M.P., Bejon P., Kremsner P.G., Addo M.M., Siegrist C.A., Phase 1 Trials of rVSV Ebola Vaccine in Africa and Europe – Preliminary Report. *N Engl J Med* **2015**; Epub ahead of print.
- [44] Ledgerwood J.E., DeZure A.D., Stanley D.A., Novik L., Enama M.E., Berkowitz N.M., Hu Z., Joshi G., Ploquin A., Sitar S., Gordon I.J., Plummer S.A., Holman L.A., Hendel C.S., Yamshchikov G., Roman F., Nicosia A., Colloca S., Cortese R., Bailer R.T., Schwartz R.M., Roederer M., Mascola J.R., Koup R.A., Sullivan N.J., Graham B.S., the VRC 207 Study Team, Chimpanzee Adenovirus Vector Ebola Vaccine – Preliminary Report. *N Engl J Med* **2015**; Epub ahead of print.
- [45] Rampling T., Ewer K., Bowyer G., Wright D., Imoukhuede E.B., Payne R., Hartnell F., Gibani M., Bliss C., Minhinick A., Wilkie M., Venkatraman N., Poulton I., Lella N., Roberts R., Sierra-Davidson K., Krähling V., Berrie E., Roman F., De Ryck I., Nicosia A., Sullivan N.J., Stanley D.A., Ledgerwood J.E., Schwartz R.M., Siani L., Colloca S., Folgari A., Di Marco S., Cortese R., Becker S., Graham B.S., Koup R.A., Levine M.M., Moorthy V., Pollard A.J., Draper S.J., Ballou W.R., Lawrie A., Gilbert S.C., Hill A.V., A Monovalent Chimpanzee Adenovirus Ebola Vaccine – Preliminary Report. *N Engl J Med* **2015**; Epub ahead of print.
- [46] Henao-Restrepo A.M., Longini I.M., Egger M., Dean N.E., Edmunds W.J., Camacho A., Carroll M.W., Doumbia M., Draguez B., Duraffour S., Enwere G., Grais R., Gunther S., Hossmann S., Kondé M.K., Kone S., Kuisma E., Levine M.M., Mandal S., Norheim G., Riveros X., Soumah A., Trelle S., Vicari A.S., Watson C.H. Keita S., Kieny M.P., Rottingen J.A., Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine expressing Ebola surface glycoprotein: interim results from the Guinea ring vaccination cluster-randomised trial. *Lancet* **2015**; 386(9996):857-66.

- [47] Vanderzanden L., Bray M., Fuller D., Roberts T., Custer D., Spik K., Jahrling P., Huggins J., Schmaljohn A., Schmaljohn C. DNA vaccines expressing either the GP or NP genes of Ebola virus protect mice from lethal challenge. *Virology* **1998**; 246(1):134-44.
- [48] Choi W.Y, Hong K.J., Hong J.E., Lee W.J., Progress of vaccine and drug development for Ebola preparedness. *Clin Exp Vaccine Res* **2015**; 4(1):11-6.
- [49] Marzi A., Feldmann H., Geisbert T.W., Falzarano D., Vesicular Stomatitis Virus-Based Vaccines for Prophylaxis and Treatment of Filovirus Infections. *J Bioterror Biodef* **2011**; S1(4).
- [50] Marzi A., Robertson S.J., Haddock E., Feldmann F., Hanley P.W., Scott D.P., Strong J.E., Kobinger G., Best S.M., Feldmann H., EBOLA VACCINE. VSV-EBOV rapidly protects macaques against infection with the 2014/15 Ebola virus outbreak strain. *Science* **2015**; 349(6249):739-42.
- [51] Geisbert T.W., Jahrling P.B., Differentiation of filoviruses by electron microscopy. *Virus Res* **1995**; 39(2-3):129-150.
- [52] Bharat T.A., Noda T., Riches J.D., Kraehling V., Kolesnikova L., Becker S., Kawaoka Y., Briggs J.A., Structural dissection of Ebola virus and its assembly determinants using cryo-electron tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**; 109(11):4275-80.
- [53] Elliott L.H., Kiley M.P., McCormick J.B., Descriptive analysis of Ebola virus proteins. *Virology* **1985**; 147(1):169-76.
- [54] Huang Y., Xu L., Sun Y., Nabel G.J., The assembly of Ebola virus nucleocapsid requires virion-associated proteins 35 and 24 and posttranslational modification of nucleoprotein. *Mol Cell* **2002**; 10(2):307-16.
- [55] Noda T., Sagara H., Suzuki E., Takada A., Kida H., Kawaoka Y., Ebola virus VP40 drives the formation of virus-like filamentous particles along with GP. *J Virol* **2006**; 76(10):4855-65.
- [56] Han Z., Boshra H., Sunyer J.O., Zwiers S.H., Paragas J., Harty R.N., Biochemical and functional characterization of the Ebola virus VP24 protein: implications for a role in virus assembly and budding. *J Virol* **2003**; 77(3):1793-800.
- [57] Feldmann H., Will C., Schikore M., Slenczka W., Klenk H.D., Glycosylation and oligomerization of the spike protein of Marburg virus. *Virology* **1991**; 182(1):353-6.
- [58] Volchkov V.E., Becker S., Volchkova V.A., Ternovoj V.A., Kotov A.N., Netesov S.V., Klenk H.D., GP mRNA of Ebola virus is edited by the Ebola virus polymerase and by T7 and vaccinia virus polymerase. *Virology* **1995**; 214(2):421-30.
- [59] Sanchez A., Trappier S.G., Mahy B.W., Peters C.J., Nichol S.T., The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**; 93(8):3602-7.
- [60] Mehedi M., Falzarano D., Seebach J., Hu X., Carpenter M.S., Schnittler H.J., Feldmann H., A new Ebola virus nonstructural glycoprotein expressed through RNA editing. *J Virol* **2001**; 85(11):54076-14.
- [61] Volchkov V.E., Volchkova V.A., Chepurinov A.A., Blinov V.M., Dolnik O., Netesov S.V., Feldmann H., Characterization of the L gene and 5' trailer region of Ebola virus. *J Gen Virol* **1999**; 80(Pt2):355-62.
- [62] Weik M., Enterlein S., Schlenz K., Mühlberger E., The Ebola virus genomic replication promoter is bipartite and follows the rule of six. *J Virol* **2005**; 79(16):10660-71.
- [63] Calain P., Roux L., The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *J Virol* **1993**; 67(8):4822-30.
- [64] Halpin K., Bankamp B., Harcourt B.H., Bellini W.J., Rota P.A., Nipah virus conforms to the rule of six in a minigenome replication assay. *J Gen Virol* **2004**; 85(Pt3):701-7.
- [65] Lott W.B., Doran M.R., Do RNA viruses require genome cyclisation for replication?. *Trends Biochem Sci* **2013**; 38(7):350-5.
- [66] Takada A., Fujioka K., Tsuji M., Morikawa A., Higashi N., Ebihara H., Kobasa D., Feldmann H., Irimura T., Kawaoka Y., Human macrophage C-type lectin specific for galactose and N-acetylgalactosamine promotes filovirus entry. *J Virol* **2004**; 78(6):2943-7.

- [67] Alvarez C.P., Lasala F., Carrillo J., Muniz O., Corbí A.L., Delgado R., C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans. *J Virol* **2002**; 76(13):6841-4.
- [68] Kondratowicz A.S., Lennemann N.J., Sinn P.L., Davey R.A., Hunt C.L., Moller-Tank S., Meyerholz D.K., Rennert P., Mullins R.F., Brindley M., Sandersfeld L.M., Quinn K., Weller M., McCray P.B.Jr., Chiorini J., Maury W., T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) is a receptor for Zaire Ebolavirus and Lake Victoria Marburgvirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**; 108(20):8426-31.
- [69] Takada A., Watanabe S., Ito H., Okazaki K., Kida H., Kawaoka Y., Downregulation of beta1 integrins by Ebola virus glycoprotein: implication for virus entry. *Virology* **2000**; 278(1):20-6.
- [70] Schornberg K.L., Shoemaker C.J., Dube D., Abshire M.Y., Delos S.E., Bouton A.H., White J.M., Alpha5beta1-integrin controls ebolavirus entry by regulating endosomal cathepsins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**; 106(19):8003-8.
- [71] Shimojima M., Takada A., Ebihara H., Neumann G., Fujioka K., Irimura T., Jones S., Feldmann H., Kawaoka Y., Tyro3 family-mediated cell entry of Ebola and Marburg viruses. *J Virol* **2006**; 80(20):10109-16.
- [72] Empig C.J., Goldsmith M.A., Association of the caveola vesicular system with cellular entry by filoviruses. *J Virol* **2002**; 76(10):5266-70.
- [73] Bhattacharyya S., Hope T.J., Young J.A., Differential requirements for clathrin endocytic pathway components in cellular entry by Ebola and Marburg glycoprotein pseudovirions. *Virology* **2011**; 419(1):1-9.
- [74] Saeed M.F., Kolokoltsov A.A., Albrecht T., Davey R.A., Cellular entry of ebola virus involves uptake by a macropinocytosis-like mechanism and subsequent trafficking through early and late endosomes. *PLoS Pathog* **2010**; 6(9):e1001110.
- [75] Nanbo A., Imai M., Watanabe S., Noda T., Takahashi K., Neumann G., Halfmann P., Kawaoka Y., Ebolavirus is internalized into host cells via macropinocytosis in a viral glycoprotein-dependent manner. *PLoS Pathog* **2010**; 6(9):e1001121.
- [76] Aleksandrowicz P., Marzi A., Biedenkopf N., Beimforde N., Becker S., Hoenen T., Feldmann H., Schnittler H.J., Ebola virus enters host cells by macropinocytosis and clathrin-mediated endocytosis. *J Infect Dis* **2011**; 204(S3):957-67.
- [77] Hunt C.L., Kolokoltsov A.A., Davey R.A., Maury W., The Tyro3 receptor kinase Axl enhances macropinocytosis of Zaire ebolavirus. *J Virol* **2011**; 85(1):334-47.
- [78] Chandran K., Sullivan N.J., Felbor U., Whelan S.P., Cunningham J.M., Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science* **2005**; 308(5728):1643-5.
- [79] Schornberg K., Matsuyama S., Kabsch K., Delos S., Bouton A., White J., Role of endosomal cathepsins in entry mediated by the Ebola virus glycoprotein. *J Virol* **2006**; 80(8):4174-8.
- [80] Coté M., Misasi J., Ren T., Bruchez A., Lee K., Filone C.M., Hensley L., Li Q., Ory D., Chandran K., Cunningham J., Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection. *Nature* **2011**; 477(7364):344-8.
- [81] Carette J.E., Raaben M., Wong A.C., Herbert A.S., Obernosterer G., Mulharker N., Kuehne A.I., Kranzusch P.J., Griffin A.M., Ruthel G., Dal Cin P., Dye J.M., Whelan S.P., Chandran K., Brummelkamp T.R., Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature* **2011**; 477(7364):340-3.
- [82] Ferron F., Decroly E., Seliska B., Canard B., The viral RNA capping machinery as target for antiviral drugs. *Antiviral Res* **2012**; 96(1):21-31.
- [83] Liang B., Li Z., Jenni S., Rahmeh A.A., Morin B.M., Grant T., Grigorieff N., Harrison S.C., Whelan S.P., Structure of the L Protein of Vesicular Stomatitis Virus from Electron Cryomicroscopy. *Cell* **2015**; 162(2):314.27.
- [84] Shabman R.S., Jabado O.J., Mire C.E., Stockwell T.B., Edwards M., Mahajan M., Geisbert T.W., Basler C.F., Deep sequencing identifies noncanonical editing of Ebola and Marburg virus RNAs in infected cells. *MBio* **2014**; 5(6):e02011.

- [85] Mühlberger E., Trommer S., Funke C., Volchkov V., Klenk H.D., Becker S, Termini of all mRNA species of Marburg virus: sequence and secondary structure. *Virology* 1996; 223(2):376-80.
- [86] Modrof J., Mühlberger E., Klenk H.D., Becker S, Phosphorylation of VP30 impairs ebola virus transcription. *J Biol Chem* 2002; 277(36):33099-104.
- [87] Martinez M.J., Volchkova V.A., Raoul H., Alazard-Dany N., Reynard O., Volchkov V.E., Role of VP30 phosphorylation in the Ebola virus replication cycle. *J Infect Dis* **2011**; 204(S3):934-40.
- [88] Biedenkopf N., Hartlieb B., Hoenen T., Becker S., Phosphorylation fo the Ebola virus VP30 influences the composition of the viral nucleocapsid complex: impact on viral transcription and replication. *J Biol Chem* **2013**; 288(16):11165-74.
- [89] Modrof J., Becker S., Mühlberger E., Ebola virus transcription activator VP30 is a zinc-binding protein. *J Virol* **2003**; 77(5):3334-8.
- [90] John S.P., Wang T., Steffen S., Longhi S., Schmaljohn C.S., Jonsson C.B., Ebola virus VP30 is an RNA binding protein. *J Virol* **2007**; 81(17):8967-76.
- [91] Hartlieb B., Modrof J., Mühlberger E., Klenk H.D., Becker S., Oligomerization of Ebola virus VP30 is essential for viral transcription and can be inhibited by a synthetic peptide. *J Biol Chem* **2003**; 278(43):41830-6.
- [92] Ilinykh P.A., Tigabu B., Ivanov A., Ammosova T., Obukhov Y., Garron T., Kumari N., Kovalskyy D., Platonov M.O., Naumchik V.S., Freiberg A.N., Nekhai S., Bukreyev A., Role of protein phosphatase 1 in dephosphorylation of Ebola virus VP30 protein and its targeting for the inhibition of viral transcription. *J Biol Chem* **2014**; 289(33):22723-38.
- [93] Mehedi M., Hoenen T., Robertson S., Ricklefs S., Dolan M.A., Taylor T., Falzarano D., Ebjhora H., Porcella S.F., Feldmann H., Ebola virus RNA editing depends on the primary editing site sequence and an upstream secondary structure. *PLoS Pathog* **2013**; 9(10):e1003677.
- [94] Weik M., Modrof J., Klenk H.D., Becker S., Mühlberger E., Ebola virus VP30-mediated transcription is regulated by RNA secondary structure formation. *J Virol* 2002; **76**(17):8532-9.
- [95] Martínez M.J., Biedenkopf N., Volchkova V., Hartlieb B., Alazard-Dany N., Reynard O., Becker S., Volchkov V., Role of Ebola virus VP30 in transcription reinitiation. *J Virol* **2008**; 82(24):12569-73.
- [96] Conzelmann K.K., Nonsegmented negative-strand RNA viruses: genetics and manipulation of viral genomes. *Annu Rev Genet* **1998**; 32:123-62.
- [97] Fearn R., Collins P.L., Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J Virol* **1999**; 73(7):5852-64.
- [98] Mühlberger E., Weik M., Volchkov V.E., Klenk H.D., Becker S., Comparison of the transcription and replication strategies of marburg virus and Ebola virus by using artificial replication systems. *J Virol* **1999**; 73(3):2333-42.
- [99] Grosfeld H., Hill M.G., Collins P.L., RNA replication by respiratory syncytial virus (RSV) is directed by the N, P, and L proteins; transcription also occurs under these conditions but requires RSV superinfection for efficient synthesis of full-length mRNA. *J Virol* **1995**; 69(9):5677-86.
- [100] Cuesta I, Geng X., Asenja A., Villanueva N., Structural phosphoprotein M2-1 of the human respiratory syncytial virus is an RNA binding protein. *J Virol* **2000**; 74(21):9858-67.
- [101] Hardy R.W., Wertz G.W., The Cys(3)-His(1) motif of the respiratory syncytial virus M2-1 protein is essential for protein function. *J Virol* **2000**; 74(13):5880-5.
- [102] Blondot M.L., Dubosclard V., Fix J., Lassoued S., Aumont-Nicaise M., Bontems F., Eléouet J.F., Sizun C., Structure and functional analysis of the RNA- and viral phosphoprotein-binding domain of the respiratory syncytial virus M2-1 protein. *PLoS Pathog* **2012**; 8(5):e1002734.

- [103] Tanner S.J., Ariza A., Richard C.A., Kyle H.F., Dods R.L., Blondot M.L., Wu W., Trincão J., Trinh C.H., Hiscox J.A., Carroll M.W., Silman N.J., Eléouet J.F., Edwards T.A., Barr J.N., Crystal structure of the essential transcription antiterminator M2-1 protein of human respiratory syncytial virus and implications of its phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**; 111(4):1580-5.
- [104] Leyrat C., Renner M., Harlos K., Huikonen J.T., Grimes J.M., Drastic changes in conformational dynamics of the antiterminator M2-1 regulate transcription efficiency in Pneumovirinae. *Elife* 2014; 3:e02674.
- [105] Mason S.W., Aberg E., Lawetz C., DeLong R., Whitehead P., Liuzzi M., Interaction between human respiratory syncytial virus (RSV) M2-1 and P proteins is required for reconstitution of M2-1-dependent RSV minigenome activity. *J Virol* **2003**; 77(19):10670-6.
- [106] Tran T.L., Castagné N., Dubosclard V., Noinville S., Koch E., Moudjou M., Henry C., Bernard J., Yeo R.P., Eléouet J.F., The respiratory syncytial virus M2-1 protein forms tetramers and interacts with RNA and P in a competitive manner. *J Virol* **2009**; 83(13): 6363-74.
- [107] Hartlieb B., Muziol T., Weissenhorn W., Becker S., Crystal structure of the C-terminal domain of Ebola virus VP30 reveals a role in transcription and nucleocapsid association. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**; 104(2):624-9.
- [108] Bertani G., Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **1951**; 62(3):293-300.
- [109] Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **1976**; 72:248-54.
- [110] Roelofs K.G., Wang J., Sintim H.O., Lee V.T., Differential radial capillary action of ligand assay for high-throughput detection of protein-metabolite interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**; 108(37):15528-33.
- [111] Donaldson G.P., Roelofs K.G., Luo Y., Sintim H.O., Lee V.T., A rapid assay for affinity and kinetics of molecular interactions with nucleic acids. *Nucleic Acids Res* **2012**; 40(7):e48.
- [112] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.
- [113] <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- [114] <http://rna.tbi.univie.ac.at/>.
- [115] <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>.
- [116] <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>.
- [117] <http://eu.idtdna.com/calc/analyser>.
- [118] <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>.
- [119] <http://www.expasy.org/>.
- [120] Calain P., Monroe M.C., Nichol S.T., Ebola virus defective interfering particles and persistent infection. *Virology* **1999**; 262(1):114-28.
- [121] Zinzula L., Esposito F., Pala D., Tramontano E., dsRNA binding characterization of full length recombinant wild type and mutants Zaire ebolavirus VP35. *Antiviral Res* **2012**; 93(3):354-63.
- [122] Köhler K., Duchardt-Ferner E., Lechner M., Damm K., Hoch P.G., Salas M., Hartmann R.K., Structural and mechanistic characterization of 6S RNA from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Biochimie* **2015**.
- [123] Reid S.P., Cárdenas W.B., Basler C.F., Homo-oligomerization facilitates the interferon-antagonist activity of the ebolavirus VP35 protein. *Virology* **2005**; 341(2):179-89.
- [124] Hoffmann S., Otto C., Kurtz S., Sharma C.M., Khaitovich P., Vogel J., Stadler P.F., Hackermueller J., Fast mapping of short sequences with mismatches, insertions and deletions using index structures. *PLoS Comput Biol* **2009**; 5(9):e1000502.
- [125] Nicol J.W., Helt G.A., Blanchard S.G. Jr., Raja A., Loraine A.E., The Integrated Genome Browser: free software for distribution and exploration of genome-scale datasets. *Bioinformatics* **2009**; 25(20):2730-1.
- [126] Blumberg B.M., Leppert M., Kolakofsky D., Interaction of VSV Leader RNA and Nucleocapsid Protein May Control VSV Genome Replication. *Cell* **1981**; 23(3):837-45.
- [127] Noton S.L., Fearn R., Initiation and regulation of paramyxovirus transcription and replication. *Virology* **2015**; 479-480C:545-554.

Anhang

I Zusammenstellung der verwendeten Oligonukleotide (*Primer*)

Nummer	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
1	(+)RNA_2-158_T7_fwd	GAT CGG ATC CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGA CAC ACA AAA AGA AAG AAG AAT TTT TAG GAT C
2	(+)RNA_2-158_T7_rev	AAT TGA ATT CCT TTG TGA TGT GGC TCT GAA ACA AAC C
3	(-)RNA_155-1_T7_fwd	GAT CGG ATC CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGT GAT GTG GCT CTG AAA CAA ACC A
4	(-)RNA_155-1_T7_rev	AAT TGA ATT CCG GAC ACA CAA AAA GAA AGA AGA ATT TTT AGG
5	(+)RNA2-158_HH fwd	GTC CGT GAG GAC GAA ACC CTT GGA ATT CAC TGG CCG TCG
6	(+)RNA2-158_HH rev	TCA TCA GAC CGG AAA GCA CAT CCG GTG ACC CTT GTG ATG TGG CTC TGA AAC
7	(-)RNA_155-1_HH fwd	GTC CGT GAG GAC GAA ACC GGA CGA ATT CAC TGG CCG TCG
8	(-)RNA_155-1_HH rev	TCA TCA GAC CGG AAA GCA CAT CCG GTG ACC GGA CAC ACA AAA AGA AAG AAG A
9	(+)RNA2-52_fwd	GAA TTC ACT GGC CGT CGT TTT ACA
10	(+)RNA2-52 rev	GTT ATT CGC ACA CAA AAG ATC CTA AAA ATT CTT C
11	(+)RNA2-120 rev	CAG TAA CAA TTT CAA TTT AAA TTC CGA TAT AAA TTT CAA TGA GAG
12	(+)RNA 56-158fwd	GGA GGA AGA TTA ATA ATT TTC CTC TCA TTG AAA TTT ATA TC
13	(+)RNA56-158 rev	TAT AGT GAG TCG TAT TAG GAT CCT CTA GAG TC
14	(-)RNA 80-1 fwd	GGG AGG AAA ATT ATT AAT CTT CCT CAT AGT TAT TCG
15	(-)RNA 155-55 rev	TGA GGA AGA TTA ATA ATT TTC CTC TCA TTG AAA TTT ATA TCG
16	(-)RNA_Δstem fwd	GGG AAG AAT AGT TAT TCG CAC ACA AAA GA
17	(-)RNA_Δstem rev	TTT CCT AAT TTT CCT CTC ATT GAA ATT TAT ATC GGA AT
18	(-)RNA 2-78 rev	GAG GAA AAT TAT TAA TCT TCC TCA TAG TTA TTC GCA
19	(+)RNA_Δstem fwd	GGT TAT TAA GAT CAT TGA AAT TTA TAT CGG AAT TTA AAT TGA AAT T

Nummer	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
20	(+)RNA_Δstem rev	TTT GTC TTC CTC ATA GTT ATT CGC ACA C
21	(+)RNA79-158 fwd	GGT CAT TGA AAT TTA TAT CGG AAT TTA AAT TGA AAT TGT TAC
22	(-)RNA118-1 fwd	GGT AAC AAT TTC AAT TTA AAT TCC GAT ATA AAT TTC AAT GAG
23	RybB fwd	CAT CAA CCC CGC CAT TTC GGT TCA AGG TTG GTG GGT TTT TTG AAT TCA CTG GCC GTC GTT TTA CA
24	RybB rev	GGC TCC ACA AAA TGG GGA CAT CAA AGA AAA GCA GTG GCC TAT AGT GAG TCG TAT TAG GAT CCT CTA GAG TC
25	-RNA 155-79 rev	TCA TTG AAA TTT ATA TCG GAA TTT AAA TTG AAA TTG TTA CTG T
26	(-)RNA 45-1 fwd	GGC ACA CAA AAG ATC CTA AAA ATT CTT CTT TC
27	(-)RNA 155-113 fwd	GTC CGG TCA CCG GAT GT
28	(-)RNA 155-113 rev	TTG TTA CTG TAA TCA CAC CTG GTT TGT TT
29	leaderhoch3 fwd	CTT TCC CAT TTT CCC TTT CGT CCG GTC ACC GGA TGT
30	leaderhoch3 rev	GGA AAA TGG GAA AGG GAA AAT CCT ATA GTG AGT CGT ATT AGG ATC CTC TAG AGT C
31	(-)RNA155-79_+hp fwd	ATA ATT TTC CTC AGA ATT CAC TGG CCG
32	(-)RNA155-79_+hp rev	TAA TCT TCC TCT CAT TGA AAT TTA TAT CGG AAT TTA AAT TGA
33	(+)RNA-hp_79-158 fwd	ATC TTC CTC TCA TTG AAA TTT ATA TCG GAA TTT AAA TTG
34	(+)RNA-hp_79-158 rev	TAA TAA TTT TCC TCC TAT AGT GAG TCG TAT TAG GAT C
35	(-)RNA155-1 NheI fwd	AAT CTT CCT CAT AGT TAT TCG CAC ACA AAA G
36	(-)RNA155-1 NheI rev	AAT TAA GCT AGC CTC ATT GAA ATT TAT ATC GGA ATT TA
37	(+)RNA2-158 NheI fwd	TAA TTA AGC TAG CCT CAT TGA AAT TTA TAT CGG AAT TTA A
38	(+)RNA2-158 NheI rev	ATC TTC CTC ATA GTT ATT CGC ACA CAA AAG
39	ctrailer fwd	GAT CGG ATC CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGA AAT ACC TTC TTT ACA ATA TAG CAG ACT AGA T
40	ctrailer rev	AAT TGA ATT CTG GAC ACA CAA AAA AGA AGA AAT AGA TTT ATT TTT AAA T
41	NheI Klon fwd	GCT AGC TTA ATT AAT CTT CCT CAT AGT TAT TCG C

42	NheI Klon rev	CTC ATT GAA ATT TAT ATC GGA ATT TAA ATT GAA ATT GTT ACT G
43	VP30_C72S fwd	CTA AAG ACA TAT CTC CGA CCT TGA AAA AAG
44	VP30_C72S rev	GTG CTG GAG GAA CTG TTA ATG G
45	tRNA Tyr fwd	CGT CAT CGA CTT CGA AGG TTC GAA TCC TTC CCC CAC CAG GGT CGG CAT GGC ATC T
46	tRNA Tyr rev	GCA GAT TTA CAG TCT GCT CCC TTT GGC CGC TCG GGA ACC CCA CCT ATA GTG AGT CGT ATT ACG AAT TCA CTG GC
47	5'-HH fwd	CGT GAG GAC GAA ACG GTA CCC GGT ACC GTC GGT GGG GTT CCC GAG C
48	5'-HH rev	GAC TCA TCA GGG TGG GGT CTC CCT ATA GTG AGT CGT ATT ACG AAT TCA CTG GCC

II Übersicht über die Affinitäten und Endpunkte der RNA-Substrate

RNA	appK _d /μM	calc. EP	exp. EP
ptRNA	2.72 ± 0.85	0.97	0.49
tRNA	n.f.	-	0.05
ΔCCA-ptRNA	n.f.	-	0.09
14 nt CU-reich	n.c.	-	0.00
28 nt CU-reich	5.26 ± 3.42	0.89	0.29
33 nt CU-reich	2.12 ± 0.57	1.19	0.66
37 nt CU-reich	0.76 ± 0.13	0.94	0.74
42 nt CU-reich	1.20 ± 0.38	1.06	0.73
37 nt GA-reich	0.61 ± 0.12	0.78	0.62
37 nt GA repeat	1.47 ± 0.32	0.64	0.40
37 nt poly(A)	3.49 ± 1.01	0.92	0.41
37 nt poly(C)	n.f.	-	0.45
37 nt poly(U)	1.91 ± 0.59	0.58	0.34
42 nt DNA CT-reich	4.68 ± 3.43	1.16	0.45
37 nt DNA poly(A)	n.c.	-	0.00
37 nt DNA GA repeat	n.f.	-	0.06
6S RNA (<i>A. aeolicus</i>)	n.c.	-	0.00

RNA	appK _d /μM	calc. EP	exp. EP
154-1	0.35 ± 0.07	0.85	0.71
154-55	0.39 ± 0.05	0.65	0.55
154-79	0.99 ± 0.32	0.49	0.36
154-113	1.08 ± 0.62	0.22	0.16
118-1	0.84 ± 0.24	0.71	0.53
80-1	0.93 ± 0.24	0.31	0.21
45-1	n.f.	-	0.01
2-158	0.49 ± 0.07	0.87	0.70
P_56-158	0.49 ± 0.09	0.51	0.45
C_56-158	n.f.	-	0.40
PPP_56-158	0.63 ± 0.07	0.67	0.53
79-158	0.77 ± 0.19	0.67	0.51
2-78	n.f.	-	0.06
ctrailer	0.23 ± 0.05	0.65	0.59
154-79_(+hp)	0.39 ± 0.07	0.72	0.62
(-hp)79-158	0.48 ± 0.09	0.87	0.71
154-1_NheI	0.61 ± 0.07	0.85	0.67
2-158_NheI	0.45 ± 0.09	0.81	0.68
80-46	n.f.	-	0.08
dsRNA	n.c.	-	0.00

Sonden	appK _d /μM	calc. EP	exp. EP
Sonde 1	0.21 ± 0.04	0.76	0.70
Sonde 2	0.90 ± 0.27	0.73	0.59
Sonde 3	1.14 ± 0.43	0.46	0.33
Sonde 4	0.44 ± 0.09	0.81	0.67

III Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
γ - ³² P-ATP	gamma- ³² P-Adenosintriphosphat
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar (mol/L)
³² P	Phosphorisotop 32
A	Adenosin
A	Alanin
<i>A. aeolicus</i>	<i>Aquifex aeolicus</i>
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C	Cystein
c	Konzentration
ca.	circa
D	Aspartat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleinsäuretriphosphate
DRaCALA	<i>Differential Radial Capillary Action of Ligand Assay</i>
dsDNA	doppelsträngige DNA
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
engl.	englisch
fwd	forward
G	Guanosin
g	Gramm
GP	Glykoprotein
h	Stunde
HCl	Salzsäure
ddH ₂ O	doppel-destilliertes Wasser
dest. H ₂ O	demineralisiertes Wasser
I	Isoleucin
i.d.R.	in der Regel
IFN	Interferon
IGR	intergenische Region
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

Kap.	Kapitel
kb	Kilobase
K_d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton (1000 g/mol)
L	Leucin
L	Liter
L-Protein	RNA-abhängige RNA Polymerase
LB	lysogeny broth
M	Molar (mol/L)
m	Meter
mA	Milliamper
MBP	Maltose-bindendes Protein
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
N	unbestimmtes Nukleotid
NP	Nukleoprotein
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nt	Nukleotid(e)
NTP	Ribonukleinsäuretriphosphate
OD	optische Dichte
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
p.a.	pro analysi (analysenrein)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pCp	Cytidin-3',5'-biphosphat
pmol	Pikomol
Pol	Polymerase
R	Arginin
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	revolutions per minute (Umdrehungszahl)
RT	Reverse Transkriptase#
RSV	Respiratorisches Syncytial Virus
s	Sekunde
S	Serin
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
ssDNA	einzelsträngige DNA
ssRNA	einzelsträngige RNA
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris/HCl, Borsäure, EDTA-Puffer

TEMED	Tetramethylenethyldiamin
T _M	Schmelzpunkt
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSR	Transkriptionsstartregion
U	Uridin
ÜNK	Übernacht-Kultur
UV	Ultraviolett
V	Volumen
V	Volt
vgl.	vergleiche
VLP	<i>virus-like particle</i>
VP	virales Protein
VSV	Vesicular Stomatitis Virus
v/v	Volumen pro Volumen %
WT	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen %
XCB	Xylencyanolblau
z.B.	zum Beispiel

IV Übersicht über Geräte und Verbrauchsmaterialien

Agarose-Gelkammer	Mini Sub Cell, Bio-Rad
Autoklav	V95, Systec
Digitalwaage	Sartorius
Elektroblotter	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer cell, Bio-Rad
Geldokumentation	Gerix 1000, Biostep
Geltrockner	483 slab dryer, Bio-Rad
Heizblock	TB1 Thermoblock, Biometra
Hybridisierungssofen	OV3, Biometra
Inkubator	Memmert BE400
Magnetrührer	Heidolph Instruments
Mikrowelle	8020E, Privileg
Nylonmembran	Roche
Nitrocellulosemembran	Millipore
Parafilm	Pechiney Platic Packaging
Pasteurpipetten	Sarstedt
Petrischalen	Sarstedt
pH-Meter	inoLab, Senton
Phosphorimager	Fuji, FLA-3000R, Fuji Film
Pipetten	Discovery, Abimed
Pipettenspitzen	Sarstedt
Polystryol-Küvetten	Sarstedt
Quartzküvette	104-QS, 10 mm Hellma
Reagiergefäße	1.5 mL/ 2.0 mL Sarstedt; 0.2 mL Biozyme
Schüttelinkubator	3033, GFL

SDS-PAGE-Kammer	Mini Protean 3 Cell, Bio-Rad
Serologische Pipetten	5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL; Sarstedt
Skalpell	Cutfix Stainles #21, B.Braun
Spannungsquelle	Power N Pac 3000, Bio-Rad
Spektral-Photometer	Biomate 3, ThermoScientific; 7305, Jenway
Thermocycler	TGradient, Biometra
Thermomixer	5436, Eppendorf
Vortex-Mixer	7-2020, neolab
Whatman-Filterpapiere	Thick Blot Paper, Bio-Rad
Zentrifugen	Biofuge pico, Fresco 17, Heraeus 5810R, Eppendorf

V Übersicht über Chemikalien und Reagenzien

1-Methylimidazol 99%	ACROS ORGANICS
2-Mercaptoethanol	Merck
Acrylamid : M-Bis 40%	GERBU
M-Bis 50%	GERBU
Agar Agar	SERVA
Agarose GTQ	Roth
Ammoniumacetat	Fluka
Ammoniumchlorid	Grüssing
Ammoniumpersulfat	Roth
Ampicillin	Roth
L-Arabinose	Roth
Bleiacetat	Roth
Borsäure	Roth
Bromophenolblau	Merck
Chloroform	Merck
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich
CDP-Star	Roche
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
dNTPs	ThermoScientific
DTT	GERBU
EDTA	GERBU
EDC	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Roth
Ethanol p.a.	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Formaldehyd	Roth
Glycerin (99.5%)	GEBRU
Heparin	Sigma-Aldrich
IPTG	Roth
Isopropanol	Roth
Magnesiumchlorid	ThermoScientific

Maleinsäure	Roth/Roche
Methanol	Roth
Natriumacetat	Fluka
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Fluka
NTPs	Roche
Phenol	Roth
Rubidiumchlorid	Roth
Rinderalbumin (BSA)	Roth
Salzsäure	Roth
Spermidin	Roth
SDS	Roth
SYBRGold	Invitrogen
TEMED	Sigma-Aldrich
Tris	Roth
Trypton	Roth
Urea	GERBU
Hefeextrakt	GERBU

VI Übersicht über Enzyme und Kits

Absolute qPCR SYBR Green Capillary Mix	ThermoScientific
DIG Easy Hyb Northern Starter Kit	Roche
DIG Wash and Block Buffer Set	Roche
Fast AP Thermosensitive Alkalische Phosphatase	ThermoScientific
DpnI	ThermoScientific
FastDigest EcoRI	ThermoScientific
FastDigest BamHI	ThermoScientific
GBX Developer and Replenisher	Kodak
GBX Fixer and Replenisher	Kodak
GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit	ThermoScientific
Illustra™ MicroSpin™ G-25 Columns	GE Healthcare
NucleoBond PC 500 Purification Kit	Macherey-Nagel
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	ThermoScientific
<i>Phusion</i> DNA Polymerase	Finnzymes
RNase T1	ThermoScientific
T4 DNA Ligase	ThermoScientific
T4 RNA Ligase	ThermoScientific
T4 Polynucleotid-Kinase	ThermoScientific
WizardR SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega